

INTERNATIONAL COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 08 December 2000 (08.12.00)	Applicant's or agent's file reference sei 1 pct
International application No. PCT/DE00/01071	Priority date (day/month/year) 08 May 1999 (08.05.99)
International filing date (day/month/year) 04 April 2000 (04.04.00)	
Applicant SEIFARTH, Wolfgang et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 21 November 2000 (21.11.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Kiwa Mpay

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts sei 1 pct	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/ 01071	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 04/04/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 08/05/1999
Anmelder RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/70

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBL

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>MACK D H ET AL: "A SENSITIVE METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF UNCHARACTERIZED VIRUSES RELATED TO KNOWN VIRUS GROUP HEPADNAVIRUS MODEL SYSTEM"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 85, Nr. 18, 1988, Seiten 6977-6981, XP002148107</p> <p>1988</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-9

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. September 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

10/10/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hagenmaier, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SEIFARTH WOLFGANG ET AL: "Retrovirus-like particles released from the human breast cancer cell line T47-D display type B- and C-related endogenous retroviral sequences." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 69, Nr. 10, 1995, Seiten 6408-6416, XP002148206 ISSN: 0022-538X	1,2
Y	das ganze Dokument ----	3-9
Y	WO 93 25707 A (TENORIO MATANZO ANTONIO ; INST DE SALUD CARLOS III (ES)) 23. Dezember 1993 (1993-12-23) das ganze Dokument ----	1-9
Y	DONEHOWER L A ET AL: "THE USE OF PRIMERS FROM HIGHLY CONSERVED POL REGIONS TO IDENTIFY UNCHARACTERIZED RETROVIRUSES BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION" JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, Bd. 28, Nr. 1, 1990, Seiten 33-46, XP000946504 ISSN: 0166-0934 das ganze Dokument ----	1-9
Y	ROSE TIMOTHY M ET AL: "Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 26, Nr. 7, 1. April 1998 (1998-04-01), Seiten 1628-1635, XP002148108 ISSN: 0305-1048 Siehe Fig. 4 and 5 das ganze Dokument ----	1-9
Y	US 5 478 724 A (MORSE STEPHEN S ET AL) 26. Dezember 1995 (1995-12-26) das ganze Dokument ----	1-9
Y	WICHMAN H A ET AL: "IN SEARCH OF RETROTRANSPOSONS EXPLORING THE POTENTIAL OF THE PCR" BIOTECHNIQUES, Bd. 13, Nr. 2, 1992, Seiten 258-263, 265, XP002148109 ISSN: 0736-6205 das ganze Dokument ----- -/--	1-9

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	INNIS ET AL.: "PCR PROTOCOLS" 1990 , ACADEMIC PRESS , US,SAN DIEGO XP002148111 "DETECTION AND TYPING OF GENITAL HUMAN PAPILLOMAVIRUS", TING ET AL. Seite 356 -Seite 367 ---	1-9
Y	WO 95 02704 A (US GOVERNMENT) 26. Januar 1995 (1995-01-26) das ganze Dokument ---	1-9
A	EP 0 789 081 A (INST DE SALUD CARLOS III) 13. August 1997 (1997-08-13) das ganze Dokument ---	
A	INNIS ET AL.: "PCR PROTOCOLS" 1990 , ACADEMIC PRESS , US,SAN DIEGO XP002148112 "DEGENERATED PRIMERS FOR DNA AMPLIFICATION" ,COMPTON Seite 39 -Seite 45 ---	
A	EP 0 229 701 A (CETUS CORP) 22. Juli 1987 (1987-07-22) das ganze Dokument ---	
T	SEIFARTH WOLFGANG ET AL: "Rapid identification of all known retroviral reverse transcriptase sequences with a novel versatile detection assay." AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, Bd. 16, Nr. 8, 20. Mai 2000 (2000-05-20), Seiten 721-729, XP002148110 ISSN: 0889-2229 das ganze Dokument -----	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/01071

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9325707	A	23-12-1993	ES 2048652 A		16-03-1994
			AU 4327593 A		04-01-1994
US 5478724	A	26-12-1995	NONE		
WO 9502704	A	26-01-1995	US 5585477 A		17-12-1996
			AU 693465 B		02-07-1998
			AU 7332494 A		13-02-1995
			EP 0789782 A		20-08-1997
			JP 9500530 T		21-01-1997
			US 5691134 A		25-11-1997
EP 0789081	A	13-08-1997	ES 2093554 A		16-12-1996
			AU 6461496 A		11-09-1996
			GB 2301888 A		18-12-1996
			CA 2188134 A		29-08-1996
			WO 9625909 A		29-08-1996
EP 0229701	A	22-07-1987	AT 127857 T		15-09-1995
			AU 606043 B		31-01-1991
			AU 6710987 A		16-07-1987
			CA 1279244 A		22-01-1991
			DE 3751513 D		19-10-1995
			DE 3751513 T		28-03-1996
			DK 10787 A		11-07-1987
			ES 2078214 T		16-12-1995
			IE 69565 B		02-10-1996
			JP 2576980 B		29-01-1997
			JP 62217161 A		24-09-1987
			JP 2574640 B		22-01-1997
			JP 6233700 A		23-08-1994
			KR 9104250 B		24-06-1991
			NZ 218865 A		29-05-1989
			US 5386022 A		31-01-1995
			US 5594123 A		14-01-1997
			US 5176995 A		05-01-1993
			US 5008182 A		16-04-1991
			ZA 8700152 A		28-09-1988

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 18 JUL 2001

WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts sei-1 / PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/01071	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 04/04/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 08/05/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/70		
Anmelder RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.



2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 21/11/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 13.07.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Leber, T Tel. Nr. +49 89 2399 7195 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-30 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-9 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1,2, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-9
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	5,6,8
	Nein: Ansprüche	1-4,7,9
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-9
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: MACK D H ET AL: 'A SENSITIVE METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF UNCHARACTERIZED VIRUSES RELATED TO KNOWN VIRUS GROUP HEPADNAVIRUS MODEL SYSTEM' PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 85, Nr. 18, 1988, Seiten 6977-6981, XP002148107 1988 ISSN: 0027-8424
- D2: SEIFARTH WOLFGANG ET AL: 'Retrovirus-like particles released from the human breast cancer cell line T47-D display type B- and C-related endogenous retroviral sequences.' JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 69, Nr. 10, 1995, Seiten 6408-6416, XP002148206 ISSN: 0022-538X
- D3: DONEHOWER L A ET AL: 'THE USE OF PRIMERS FROM HIGHLY CONSERVED POL REGIONS TO IDENTIFY UNCHARACTERIZED RETROVIRUSES BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION' JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, Bd. 28, Nr. 1, 1990, Seiten 33-46, XP000946504 ISSN: 0166-0934

1. Neuheit

- 1.1 Die Ansprüche 1 und 2 sind neu (Art 33(2) PCT), da die genauen Sequenzen der Primer bzw. des "Kopf"-Abschnittes den im Recherchenbericht genannten Dokumenten nicht entnommen werden können.
- 1.2 Ansprüche 3-8 sind neu (Art 33(2) PCT), da ein Verfahren unter Verwendung der in Anspruch 1 genannten Primer in Kombination mit dem RDBH-Verfahren den im Recherchenbericht genannten Dokumenten nicht entnommen werden kann.
- 1.3 Anspruch 9 ist neu (Art 33(2) PCT), da ein Diagnosekit zum spezifischen Nachweis von retroviraler Nukleinsäuren/Retroviren nicht in den im

Recherchenbericht genannten Dokumenten aufgeführt ist.

2. Erfinderische Tätigkeit

2.1 Jedes der Dokumente D1-D3 für sich genommen stellt den nächsten Stand der Technik für die Ansprüche 1 und 2 dar (D1: Seite 6977 Abstract; Seite 6978 Fig. 1; Seite 6979 Fig. 2 und "Role of 5' Extension of Primers; D2: Seite 6408 Abstract; Seite 6409 "RT-PCR and controls"; D3: Seite 33 "Summary"; Seite 37, Fig. 1 und "Design and testing of "universal" retrovirus primers"). Ansprüche 1 und 2 unterscheiden sich von D1-D3 lediglich darin, daß die Sequenzen der Primer in den Primermischungen (Anspruch 1) und die Sequenz des "Kopf"-Abschnitts (Anspruch 2), nicht vollständig identisch sind. Ein überraschender technischer Effekt ist für die in Anspruch 1 und 2 genannten Primer und den "Kopf"-Abschnitt gegenüber den in D1-D3 dargestellten Sequenzen nicht erkennbar.

Das technische Problem besteht somit in der Bereitstellung alternativer Sequenzen für die Primer und den "Kopf"-Abschnitt.

Für den Fachmann ist es Routine PCR-Primer zu entwerfen, diese mit einem "Kopf"-Abschnitt zu versehen und den gewählten experimentellen Bedingungen anzupassen. Der in Anspruch 1 und 2 beschriebenen Lösung des technischen Problems kann somit kein erfinderischer Schritt zuerkannt werden (Art 33(4) PCT).

2.2 Jedes der Dokumente D1-D3 für sich genommen stellt den nächsten Stand der Technik für die Ansprüche 3-8 dar (D1: Seite 6977 Abstract; Seite 6978 Fig. 1; Seite 6979 Fig. 2 und "Role of 5' Extension of Primers; D2: Seite 6408 Abstract; Seite 6409 "RT-PCR and controls"; D3: Seite 33 "Summary"; Seite 37, Fig. 1 and "Design and testing of "universal" retrovirus primers").

2.2.1 Der Unterschied der Ansprüche 3, 4 und 7 zu den Dokumenten D1-D3 besteht darin, daß eine alternative Nachweismethode, nämlich RDBH (Reverse Dot Blot Hybridisation) statt Klonierung gefolgt von Sequenzierung, verwendet wird. RDBH und verwandte Methoden, wie sie auch in der Beschreibung vorliegender Patentanmeldung genannt sind (Seite 7, Linie 22 - Seite 8, Linie 27), gehören seit Jahren zum Stand der Technik um,

beispielsweise, eine Vielzahl von PCR-Produkten in einem einzigen Hybridisierungsschritt zu identifizieren (Schlagwort: RNA-Profiling). Für den Fachmann ist es offensichtlich die auf der Membran oder dem Bio-Chip aufgetragenen synthetischen Oligonukleotide so auszuwählen, daß ein spezifischer und empfindlicher Nachweis ermöglicht wird. Aus diesen Gründen kann den Ansprüchen 3, 4 und 7 kein erfinderischer Schritt zuerkannt werden (Art 33(4) PCT).

- 2.2.2 Der Unterschied der Ansprüche 5, 6 und 8 zum nächsten Stand der Technik besteht darin, daß die Detektion eines PCR-Produkts nicht durch ein einziges Oligonukleotid sondern durch zwei unterschiedliche Oligonukleotide durchgeführt wird. Dieses Merkmal löst das technische Problem der sich mit zunehmender Länge des zu synthetisierenden Oligonukleotids reduzierenden Syntheseeffizienz und erscheint deshalb erfinderisch zu sein (Art 33(4) PCT).
- 2.3 Eine erfinderische Tätigkeit (Art 33(4) PCT) kann Anspruch 9 nicht zuerkannt werden, da es für den Fachmann eine Routinetätigkeit darstellt, eine erfolgreiche Labormethode in ein Kit umzusetzen, so daß auch der technisch weniger versierte diese Methode schnell und erfolgreich durchführen kann.

3. Gewerbliche Anwendbarkeit

- 3.1 Die Ansprüche der vorliegenden Patentanmeldung beziehen sich auf einen Gegenstand der das Kriterium der gewerblichen Anwendbarkeit zu erfüllen scheint (Art 33(1)(4) PCT).

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

1. Um der Regel 5.1(a)(ii) zu entsprechen wird der Anmelder aufgefordert die Dokumente D1-D3 in der Beschreibung zu nennen und deren relevante Teile kurz darzustellen sofern diese für eventuell geänderte Ansprüche noch von Bedeutung

sind.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1. Der Ausdruck "Klammer-Sequenz" in Anspruch 1 ist unklar (Art 6 PCT) da diesem Begriff im Zusammenhang mit einer Hybridisierungsreaktion keine eindeutige Bedeutung zugeordnet werden kann.
2. Das Wort "deren" in Anspruch 1 ist unklar (Art 6 PCT) im Hinblick auf seinen Bezug (Nukleotidsequenz oder Klammer-Sequenz).
3. Die Sequenzen SEQ ID NO. 1-4 in Anspruch 1 sind nicht klar definiert. In der Beschreibung scheint die jeweilige Sequenz, die "Kopf"-Sequenz zu umfassen (Seite 5, Linien 16 - Seite 6, Linie 6) in Anspruch 1 jedoch nicht (Art 6 PCT).
4. Anspruch 1 ist dahingehend unklar (Art 6 PCT), ob die Primermischungen MOP und MOP-C die Gesamtheit aller möglichen durch die Degeneration des genetischen Kodes sich ergebenden Primer enthält. Ferner wird der Anmelder aufgefordert darüber Auskunft zu geben, ob die in vorliegender Patentanmeldung durchgeführten Versuche zur Stützung des Anspruchs mit einer Primermischung durchgeführt wurden, die tatsächlich alle möglichen Primer enthält (Art 6 PCT).
5. Die Abkürzung "RBDH" in den Ansprüchen 3, 4 usw. ist unklar (Art 6 PCT) und sollte ausformuliert werden.
6. Der Ausdruck "... die jeweils (je Sonde)..." in Anspruch 3 sollte zur Verbesserung der Klarheit umformuliert werden (Art 6 PCT).
7. Der Ausdruck "vorzugweise" in den Ansprüchen 5, 6 etc. führt zu Unklarheiten über den genauen Schutzzumfang der Ansprüche (Art 6 PCT).
8. Der Ausdruck "gleich groß" im Zusammenhang mit Oligonukleotiden ist unklar (Art 6 PCT).

9. Der Ausdruck "Abschnitt dieser Region" in den Ansprüchen 4 und 7 ist unklar (Art 6 PCT) und erweitert den Schutzbereich über das durch die Beschreibung gestützte hinaus, da selbst ein einziges Nukleotid einen "Abschnitt dieser Region" darstellt.
10. Die Bedeutung von "...die zusammen..." in Anspruch 8 ist unklar (Art 6 PCT).
11. Bei einer Reihe von zitierter Literatur fehlt die vollständige Literaturangabe (zum Beispiel Seite 1, Zeilen 20, 21, 26 usw.).

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference sei 1 pct	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/01071	International filing date (day/month/year) 04 April 2000 (04.04.00)	Priority date (day/month/year) 08 May 1999 (08.05.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/70		
Applicant RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 21 November 2000 (21.11.00)	Date of completion of this report 13 July 2001 (13.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/01071

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-30 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____ 1-9 _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages _____ 1/4-4/4 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
pages _____ 1,2 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☒ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/01071

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	5, 6, 8	YES
	Claims	1-4, 7, 9	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

- D1: MACK D. H. ET AL.: "A SENSITIVE METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF UNCHARACTERIZED VIRUSES RELATED TO KNOWN VIRUS GROUP HEPADNAVIRUS MODEL SYSTEM", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Vol. 85, No. 18, 1988, pages 6977-6981, XP002148107, 1988, ISSN: 0027-8424
- D2: SEIFARTH WOLFGANG ET AL.: "Retrovirus-like particles released from the human breast cancer cell line T47-D display type B- and C-related endogenous retroviral sequences." JOURNAL OF VIROLOGY, Vol. 69, No. 10, 1995, pages 6408-6416, XP002148206, ISSN: 0022-538X
- D3: DONEHOWER L. A. ET AL.: "THE USE OF PRIMERS FROM HIGHLY CONSERVED POL REGIONS TO IDENTIFY UNCHARACTERIZED RETROVIRUSES BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, Vol. 28, No. 1, 1990, pages 33-46, XP000946504, ISSN: 0166-0934.

1. Novelty

- 1.1 Claims 1 and 2 are novel (PCT Article 33(2)) because the exact sequences of the primer or "head" segment

are not found in the search report citations.

1.2 Claims 3-8 are novel (PCT Article 33(2)) because a method using the primer as per Claim 1 and combined with the RDBH method cannot be found in the search report citations.

1.3 Claim 9 is novel (PCT Article 33(2)) because a diagnostic kit for specifically detecting retroviral nucleic acids or retrovirus is not found in the search report citations.

2. Inventive step

2.1 Each of the documents D1-D3 represents the prior art closest to Claims 1 and 2 (D1: page 6977, Abstract; page 6978, Fig. 1; page 6979, Fig. 2 and "Role of 5' Extension of Primers"; D2: page 6408, Abstract; page 6409, "RT-PCR and controls"; D3: page 33, "Summary"; page 37, Fig. 1 and "Design and testing of "universal" retrovirus primers"). Claims 1 and 2 differ from D1-D3 only in that the primer sequences in the primer mixtures (Claim 1) and the sequence of the "head" segment (Claim 2) are not entirely identical. A surprising technical effect in relation to the sequences depicted in D1-D3 cannot be recognised in the primer and "head" segment as per Claims 1 and 2. The technical problem in question therefore consists in providing alternative sequences for the primer and "head" segment.

It is a matter of routine for a person skilled in the art to design PCR primers, to provide them with a "head" segment and to adapt them to the selected experimental conditions. The solution to the

technical problem, as described in Claims 1 and 2, therefore cannot be acknowledged to involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

2.2 Each of the documents D1-D3 represents the prior art closest to Claims 3-8 (D1: page 6977, Abstract; page 6978, Fig. 1; page 6979, Fig. 2 and "Role of 5' Extension of Primers"; D2: page 6408, Abstract; page 6409, "RT-PCR and controls"; D3: page 33, "Summary"; page 37, Fig. 1 and "Design and testing of "universal" retrovirus primers").

2.2.1 Claims 3, 4 and 7 differ from D1-D3 in that an alternative detection method, RDBH (Reverse Dot Blot Hybridisation), is used instead of cloning followed by sequencing. RDBH and related methods, such as those which are also indicated in the description of the present application (page 7, line 22 - page 8, line 27), have been used for years in the prior art, for example for identifying a plurality of PCR products in a single hybridisation step (keyword: RNA profiling). It is obvious for a person skilled in the art to apply synthetic oligonucleotides which enable specific and sensitive detection to the membrane or biochip. For these reasons, no inventive step can be acknowledged in Claims 3, 4 and 7 (PCT Article 33(3)).

2.2.2 Claims 5, 6 and 8 differ from the closest prior art in that a PCR product is detected by two different oligonucleotides rather than by a single oligonucleotide. The longer the oligonucleotide to be synthesised, the less efficient is its synthesis. This feature solves this technical problem and therefore appears to be inventive (PCT Article 33(3)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/01071

2.3 Claim 9 cannot be acknowledged to involve an inventive step (PCT Article 33(3)) because it is a matter of routine for a person skilled in the art to design a successful laboratory method in the form of a kit in order to enable even less technically qualified persons to apply the method quickly and successfully.

3. Industrial applicability

3.1 The claims in the present application concern a subject matter which appears to meet the requirement of PCT Article 33(1)-(4) for industrial applicability.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/01071

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. Pursuant to PCT Rule 5.1(a)(ii), the applicant is requested to cite documents D1-D3 in the description and to briefly outline their relevant parts, insofar as they are still relevant to possibly amended claims.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/01071

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The expression "clamp sequence" in Claim 1 is unclear (PCT Article 6) because this expression does not have an unequivocal meaning in the context of a hybridisation reaction.
2. It is not clear to what the words "of which" in Claim 1 refer (to the nucleotide sequence or to the clamp sequence?) (PCT Article 6).
3. The sequences of SEQ ID NOS. 1-4 in Claim 1 are not clearly defined. In the description, the sequences appear to include the respective "head" segment (page 5, line 16 - page 6, line 6), but not in Claim 1 (PCT Article 6).
4. It is not clear in Claim 1 (PCT Article 6) whether the primer mixtures MOP and MOP-C contain the totality of all possible primers resulting from the degeneration of the genetic code. Moreover, the applicant is requested to specify whether the assays carried out in the present application in order to support the claim have been carried out with a primer mixture that actually contains all the possible primers (PCT Article 6).
5. The abbreviation "RBDH" in Claims 3, 4, etc. is unclear (PCT Article 6) and should be spelled out.
6. The expressions "each (each probe) containing..." in Claim 3 should be redrafted to make it clearer (PCT Article 6).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/01071

VIII. Certain observations on the international application

7. The expression "preferably" in Claims 5, 6, etc. makes the exact scope of protection of the claims unclear (PCT Article 6).
8. The expression "equally large" is unclear in the context of oligonucleotides (PCT Article 6).
9. The expression "segment of this region" in Claims 4 and 7 is unclear (PCT Article 6) and extends the scope of protection beyond what is justified by the description, since even a single nucleotide represents a "segment of this region".
10. The meaning of "which together..." in Claim 8 is unclear (PCT Article 6).
11. The bibliographical data for a number of cited documents is incomplete (for example page 1, lines 20, 21, 26, etc.).

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

RUDOLPH, Ulrike
In der Schanz 10
D-69198 Schriesheim
ALLEMAGNE

Einfach 24.11.00

Date of mailing (day/month/year) 16 November 2000 (16.11.00)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference sei 1 pct			
International application No. PCT/DE00/01071	International filing date (day/month/year) 04 April 2000 (04.04.00)	Priority date (day/month/year) 08 May 1999 (08.05.99)	
Applicant RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,KP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,
GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,
NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
16 November 2000 (16.11.00) under No. WO 00/68435

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

Continuation of Form PCT/IB/308

NOTICE CONCERNING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF
THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

Date of mailing (day/month/year) 16 November 2000 (16.11.00)	IMPORTANT NOTICE
Applicant's or agent's file reference sei 1 pct	International application No. PCT/DE00/01071
<p>The applicant is hereby notified that, at the time of establishment of this Notice, the time limit under Rule 46.1 for making amendments under Article 19 has not yet expired and the International Bureau had received neither such amendments nor a declaration that the applicant does not wish to make amendments.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. Application No
PO 00/01071

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MACK D H ET AL: "A SENSITIVE METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF UNCHARACTERIZED VIRUSES RELATED TO KNOWN VIRUS GROUP HEPADNAVIRUS MODEL SYSTEM" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 85, no. 18, 1988, pages 6977-6981, XP002148107 1988 ISSN: 0027-8424 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 September 2000

Date of mailing of the international search report

10/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5518 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-8040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-8018

Authorized officer

Hagenmaier, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. Application No
PC 00/01071

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SEIFARTH WOLFGANG ET AL: "Retrovirus-like particles released from the human breast cancer cell line T47-D display type B- and C-related endogenous retroviral sequences." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 69, no. 10, 1995, pages 6408-6416, XP002148206 ISSN: 0022-538X	1,2
Y	the whole document	3-9
Y	WO 93 25707 A (TENORIO MATANZO ANTONIO ✓ ;INST DE SALUD CARLOS III (ES)) 23 December 1993 (1993-12-23) the whole document	1-9
Y	DONEHOWER L A ET AL: "THE USE OF PRIMERS FROM HIGHLY CONSERVED POL REGIONS TO IDENTIFY UNCHARACTERIZED RETROVIRUSES BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION" JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, vol. 28, no. 1, 1990, pages 33-46, XP000946504 ISSN: 0166-0934 the whole document	1-9
Y	ROSE TIMOTHY M ET AL: "Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 26, no. 7, 1 April 1998 (1998-04-01), pages 1628-1635, XP002148108 ISSN: 0305-1048 see Fig. 4 and 5 the whole document	1-9
Y	US 5 478 724 A (MORSE STEPHEN S ET AL) ✓ 26 December 1995 (1995-12-26) the whole document	1-9
Y	WICHMAN H A ET AL: "IN SEARCH OF RETROTRANSPOSONS EXPLORING THE POTENTIAL OF THE PCR" BIOTECHNIQUES, vol. 13, no. 2, 1992, pages 258-263, 265, XP002148109 ISSN: 0736-6205 the whole document	1-9

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT 00/01071

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	INNIS ET AL.: "PCR PROTOCOLS" ✓ 1990 , ACADEMIC PRESS , US,SAN DIEGO XP002148111 "DETECTION AND TYPING OF GENITAL HUMAN PAPILLOMAVIRUS", TING ET AL. page 356 -page 367	1-9
Y	WO 95 02704 A (US GOVERNMENT) ✓ 26 January 1995 (1995-01-26) the whole document	1-9
A	EP 0 789 081 A (INST DE SALUD CARLOS III) ✓ 13 August 1997 (1997-08-13) the whole document	
A	INNIS ET AL.: "PCR PROTOCOLS" ✓ 1990 , ACADEMIC PRESS , US,SAN DIEGO XP002148112 "DEGENERATED PRIMERS FOR DNA AMPLIFICATION" ,COMPTON page 39 -page 45	
A	EP 0 229 701 A (CETUS CORP) ✓ 22 July 1987 (1987-07-22) the whole document	
T	SEIFARTH WOLFGANG ET AL: "Rapid" ✓ identification of all known retroviral reverse transcriptase sequences with a novel versatile detection assay." AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol. 16, no. 8, 20 May 2000 (2000-05-20), pages 721-729, XP002148110 ISSN: 0889-2229 the whole document	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/JP90/01071

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9325707 A	23-12-1993	ES 2048652 A AU 4327593 A	16-03-1994 04-01-1994
US 5478724 A	26-12-1995	NONE	
WO 9502704 A	26-01-1995	US 5585477 A AU 693465 B AU 7332494 A EP 0789782 A JP 9500530 T US 5691134 A	17-12-1996 02-07-1998 13-02-1995 20-08-1997 21-01-1997 25-11-1997
EP 0789081 A	13-08-1997	ES 2093554 A AU 6461496 A GB 2301888 A CA 2188134 A WO 9625909 A	16-12-1996 11-09-1996 18-12-1996 29-08-1996 29-08-1996
EP 0229701 A	22-07-1987	AT 127857 T AU 606043 B AU 6710987 A CA 1279244 A DE 3751513 D DE 3751513 T DK 10787 A ES 2078214 T IE 69565 B JP 2576980 B JP 62217161 A JP 2574640 B JP 6233700 A KR 9104250 B NZ 218865 A US 5386022 A US 5594123 A US 5176995 A US 5008182 A ZA 8700152 A	15-09-1995 31-01-1991 16-07-1987 22-01-1991 19-10-1995 28-03-1996 11-07-1987 16-12-1995 02-10-1996 29-01-1997 24-09-1987 22-01-1997 23-08-1994 24-06-1991 29-05-1989 31-01-1995 14-01-1997 05-01-1993 16-04-1991 28-09-1988

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM ÜBERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 : C12Q 1/70	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/68435 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. November 2000 (16.11.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01071 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. April 2000 (04.04.00) (30) Prioritätsdaten: 199 21 419.0 8. Mai 1999 (08.05.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG [DE/DE]; Seminarstrasse 2, D-69117 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SEIFARTH, Wolfgang [DE/DE]; Oderweg 11, D-69226 Nussloch (DE). LEIB-MÖSCH, Christine [DE/DE]; Nadistrasse 23, D-80809 München (DE). BAUST, Corinna [DE/DE]; Schlossweg 30 a, D-69190 Walldorf (DE). (74) Anwalt: RUDOLPH, Ulrike; In der Schanz 10, D-69198 Schriesheim (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: METHOD FOR SPECIFICALLY DETECTING AND IDENTIFYING RETROVIRAL NUCLEIC ACIDS/RETROVIRUSES IN AN ITEM TO BE EXAMINED		
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM SPEZIFISCHEN NACHWEIS UND ZUR IDENTIFIZIERUNG RETROVIRALER NUKLEINSÄUREN/RETROVIREN IN EINEM UNTERSUCHUNGSGUT		
(57) Abstract		
<p>The invention relates to a method for specifically detecting and identifying retroviral nucleic acids/retroviruses in any item to be examined using RT-PCR and reverse dot blot hybridization (RDBH) as well as to diagnosis kits for carrying out said method. The invention also relates to retrovirus-specific, oligonucleotide/primer mixtures (MOP) which comprise forward primers and reverse primers and which are provided for generating amplification products of retrovirus-specific nucleic acids from the item to be examined. These inventive primary mixtures (MOP-ABD, MOP-C) are comprised of retrovirus-specific, degenerated oligonucleotides which correspond to the highly conserved regions located within the reverse transcriptase gene (RT-gene) of all known human retroviruses and which have a head or extension sequence consisting of a clamping and interface sequence. The invention also relates to retrovirus-specific probes for the RDBH, whereby defined quantities of synthetically produced, precisely defined nucleic acid sequences are concerned which stem from the reverse transcriptase gene of those retroviruses already characterized, against which the item to be examined should be tested, and which do not overlap at all with the nucleotide sequences of the forward primers and reverse primers used in the PCR or RT-PCR.</p>		
(57) Zusammenfassung		
<p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum spezifischen Nachweis und zur Identifizierung retroviraler Nukleinsäuren/Retroviren in einem beliebigen Untersuchungsgut mittels RT-PCR und Reverse Dot Blot Hybridisierung (RDBH) sowie Diagnosekits zur Durchführung dieses Verfahrens. Sie betrifft ausserdem retroviruspezifische, Vorwärts- und Umkehrprimer umfassende Oligonukleotid-Primermischungen (MOP) für die Erzeugung von Amplifikaten retroviruspezifischer Nukleinsäuren aus dem Untersuchungsgut. Diese erfindungsgemässen Primermischungen (MOP-ABD, MOP-C) bestehen aus retroviruspezifischen, degenerierten, zu den hochkonservierten Regionen innerhalb des Reverse Transkriptase Gens (RT-Gens) aller bekannten humanen Retroviren korrespondierenden Oligonukleotiden mit einer aus Klammer- und Schnittstellensequenz bestehende Kopf- bzw. Extensionssequenz. Zudem betrifft die Erfindung auch retroviruspezifische Sonden für die RDBH, wobei es sich um bestimmte Mengen synthetisch erzeugter, genau definierter Nukleinsäuresequenzen handelt, die aus dem Reverse Transkriptase Gen derjenigen bereits charakterisierten Retroviren stammen, gegen die das Untersuchungsgut getestet werden soll, und die keine Überlappung mit den Nukleotidsequenzen der in der PCR oder RT-PCR eingesetzten Vorwärtsprimern (forward primer) und Umkehrprimern (reverse primer) aufweisen.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KR	Korea	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

531 Rec'd PCT/AT 08 NOV 2001

**"Verfahren zum spezifischen Nachweis und zur Identifizierung
retroviraler Nukleinsäuren / Retroviren in einem Untersuchungsgut"**

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum spezifischen Nachweis und zur Identifizierung retroviraler Nukleinsäuren / Retroviren in einem beliebigen Untersuchungsgut und Diagnosekits zur Durchführung dieses Verfahrens. Sie betrifft außerdem
10 retroviruspezifische Sonden für die Reverse Dot Blot Hybridisierung und retroviruspezifische, Vorwärts- und Umkehrprimer umfassende Oligonukleotid-Primer-mischungen (MOP) für die Erzeugung von Amplifikaten retroviruspezifischer Nukleinsäuren aus dem Untersuchungsgut.

15 Exogene und endogene Retroviren (HERV) sind ätiologisches Agens für eine Vielzahl von tumorigenen Erkrankungen bei Mensch und Tier. In zahlreichen Tiermodellen, aber auch beim Menschen (HTLV-I und II) sind sie an der Entstehung von Tumoren und Leukämien beteiligt. Andere hingegen verursachen Immundefizienzerkrankungen (HIV). Gegenwärtige Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß Retroviren auch als Auslöser
20 von Autoimmunerkrankungen (Kalden und Herrmann, 1993) und neuronalen degenerativen Erkrankungen wie multipler Sklerose (Tuke et al. 1997) eine Rolle spielen können. Intensive Forschung auf dem Gebiet der endogenen und exogenen Retroviren führte bislang zur Entdeckung laufend neuer retroviraler Sequenzen im menschlichen Erbgut, deren Expression möglicherweise mit bestimmten Erkrankungen assoziiert sein
25 könnte. So ist die Expression von Gag-Proteinen der HERV-K Familie mit fast allen Formen testikulärer und ovarieller Keimzelltumoren assoziiert (Sauter et al. 1995). In menschlichen Seren wurden Antikörper gegen HERV-K Env Protein nachgewiesen (Vogetseder et al. 1993). Das *env* Gen von HERV-K-IDD, das aus Patienten mit Diabetes Typ-1 isoliert wurde, kodiert möglicherweise für ein endogenes Superantigen
30 (Conrad et al. 1997).

Zur Korrelation bestimmter Erkrankungen mit der Aktivität bestimmter endogener oder exogener Retroviren sind statistisch abgesicherte Studien mit großen Patientenkollektiven notwendig. Der hierfür erforderliche Zeit- und Kostenaufwand mit den im Stand der Technik bekannten Nachweisverfahren ist immens.

5

Der zunehmende Einsatz retroviraler Vektorsysteme in der humanen Gentherapie wirft Fragen hinsichtlich der Sicherheit vor unerwünschten Nebenwirkungen (Genomveränderungen in den Zielzellen, Übertragung unerwünschter Viren) auf. So werden in Verpackungszelllinien zu einem gewissen Prozentsatz auch unerwünschte Genabschnitte endogener oder fremder Retroviren in die therapeutisch zu applizierenden retroviralen Partikel mitverpackt (Co-packaging, Sherwin et al. 1987, Scolnick et al. 1979, Takeuchi et al. 1992). So konnten Transkripte bestimmter endogener Retroviren, wie sie in verwandter Form auch im Genom von Verpackungszelllinien vorhanden sind, in Retrovirus-ähnlichen Partikeln (Pseudotypen) der Brustkrebszelllinie T47D nachgewiesen werden (Seifarth et al. 1995, 1998). Die Verpackung solcher unerwünschten retroviralen Sequenzen kann zur Rekombination und zur Entstehung neuer Retroviren mit veränderten, möglicherweise pathogenen Eigenschaften, führen. Die Neuintegration solcher rekombinanten Retroviren im Genom der Zielzellen kann zu Insertionsmutagenese und dadurch zur Inaktivierung wichtiger Gene des Zellzyklus und möglicherweise zur Tumorgenese führen.

20

Aus diesem Grund ist es notwendig, mit einem empfindlichen Testsystem eine Qualitätskontrolle der gentherapeutisch einzusetzenden Genvektorpräparationen durchzuführen. Damit könnte vermieden werden, daß unerwünschte retrovirale Sequenzen transfundiert werden. Bei positivem Nachweis könnte eine Vektorpräparation vor der Gabe an den Patienten noch einer entsprechenden Reinigung (Purging) unterzogen werden. Die im Stand der Technik bislang bekannten Verfahren sind für einen solchen Einsatz nicht geeignet.

25

Eine gegenwärtig umstrittene Frage ist der Einsatz von Tierorganen für die Transplantation am Menschen (Xenotransplantation). So werden aus Ermangelung

30

geeigneter Spender dem Menschen vermehrt Herzklappen von Schweinen transplantiert. Auch die Übertragung von Herz-, Leber- und Nieren-Transplantaten ist geplant. Jüngste Untersuchungen ergaben aber, daß es im Rahmen der Transplantation und der damit verbundenen medikamentösen Immunsuppression beim Empfänger zur Aktivierung

5 endogener oder bislang supprimierter exogener Retroviren im Spenderorgan kommen kann. Wie experimentell bereits nachgewiesen wurde, sind diese Retroviren tierischen Ursprungs pathogen für bestimmte menschliche Zelltypen (Xenotropismus) und könnten somit zu einer ernsthaften systemischen Erkrankung des Organempfängers führen. Im Falle der Bildung pathogener infektiöser Viruspartikel ist auch eine Übertragung auf

10 unbeteiligte Dritte (Epidemie) nicht auszuschließen. Nicht zuletzt könnten Rekombinationen von Retroviren tierischen Ursprungs mit endogenen humanen Retroviren zu neuen pathogenen Virusrekombinanten mit völlig neuen Wirtstropismen führen.

Es besteht daher der Bedarf an schnellen, zuverlässigen und zugleich preisgünstigen

15 Detektionssystemen, mit dem Transplantat-Träger regelmäßig auf eine Infektion mit Retroviren tierischen Ursprungs getestet werden können.

Für den Nachweis viraler Infektionen stehen im Stand der Technik bislang eine Reihe von Methoden des direkten und indirekten Virus-Nachweises zur Verfügung. Zum direkten

20 Nachweis von Viruspartikeln, Produkten der viralen Replikation (virale Antigene) oder einer gegen das Virus gerichtete Immunantwort (antivirale Antikörper), gehören Elektronenmikroskopie (EM), Färbung viraler Proteine mit fluoreszierenden Antikörpern, „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) und Radioimmunassays (RIA). Zum direkten Nachweis des Virus und seiner Nukleinsäuren werden auch

25 zunehmend molekularbiologische Methoden, wie Nukleinsäurehybridisierungen mit Virus-spezifischen Sonden (Dot-Blot, Southern-Blot, Northern-Blot) sowie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Virus-spezifischen Primern durchgeführt.

Mit den indirekten Methoden werden in der Regel nicht die Viren selbst, sondern ihre

30 Folgeerscheinungen, d. h. die durch eine Virusvermehrung (Replikation) induzierten Veränderungen (zytopathische Effekte) in Zellen nachgewiesen. Dies muß meist in einem

auf das nachzuweisende Virus zugeschnittenen *in vitro* Zellkultursystem durchgeführt werden. Dafür werden lebende Zellen, in denen das nachzuweisende Virus replizieren kann, benötigt. Je nach Virustyp sind Zellkulturen, Organkulturen, befruchtete Hühnereier oder sogar Labortiere für den Nachweis erforderlich. Das Erscheinungsbild des zytopathischen Effekts (Zell-Lyse, fokales oder diffuses Zellwachstum, Synzytienbildung, Abrundung) und das Wirtsspektrum des Virus wird als Indiz für die Identifizierung des Virusisolates herangezogen. Oft aber ist die genaue Identifizierung nur in Kombination mit serologischen oder molekularbiologischen Methoden (PCR) möglich.

10

Die relativ geringe Sensitivität einiger direkter Nachweismethoden (EM, Antikörperfärbung) macht es notwendig, daß das Untersuchungsmaterial für einen erfolgreichen Nachweis eine bestimmte Menge an Virus enthalten muß oder durch geeignete Methoden (Ultrazentrifugation) angereichert werden muß. Ist dies nicht praktikierbar, muß das Virus vorher in einem speziellen *in vitro* Zellkultursystem angezüchtet werden. Da viele Viren spezielle Wirtszelltropismen besitzen, ist für jedes zu testende Virus ein spezielles Testsystem notwendig. Dies resultiert in hohen Laborkosten, deren Auswertung zum Teil sehr zeitintensiv ist und sehr viel Erfahrung erfordert.

20 Serologische Methoden (ELISA, RIA) sind in der Regel hochsensitiv und haben sich zum gängigen Goldstandard in der Virusdiagnostik entwickelt. Der Nachteil aller serologischer Methoden ist aber, daß für jeden zu testenden Virus ein spezifischer Antikörper notwendig ist. In einem Testdurchlauf kann die zu untersuchende Probe somit nur auf ein putatives Virus getestet werden. Die Untersuchungen von ganzen Expressionsmustern ist mit diesen Methoden nur unter großem zeitlichen und finanziellen Aufwand möglich.

Entwicklungen auf dem Gebiet der Molekularbiologie haben zur Entwicklung neuer Nachweismethoden (Hybridisierungen, PCR) geführt, die eine ähnliche Empfindlichkeit wie serologische Antigen-Nachweismethoden besitzen. Auch hier steht und fällt der Nachweiserfolg mit der Verfügbarkeit Virus-spezifischer Sonden (Hybridisierung) oder Oligonukleotide (PCR). Da der Einsatz mehrerer Sonden oder PCR-Primer

30

aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen in einem Reaktionsansatz limitiert ist, müssen zum Nachweis komplexer Expressionmuster ebenfalls viele Experimente parallel durchgeführt werden.

- 5 Angesichts der vorstehend geschilderten Umstände war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein leistungsfähiges und zuverlässiges, zugleich schnelles Verfahren zum multiplen Nachweis endogener und exogener Retroviren menschlichen und tierischen Ursprungs bereitzustellen.
- 10 Diese Aufgabe wird mit einem Verfahren der eingangs genannten Art gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es die folgenden Maßnahmen umfaßt:
- Isolierung der Nukleinsäuren, nämlich DNS- und/oder RNS, aus dem Untersuchungsgut,
- Durchführung einer PCR mit der isolierten DNS oder einer RT-PCR mit der isolierten RNS unter Verwendung von einer oder beiden der nachfolgend dargestellten,
- 15 jeweils aus Vorwärtsprimern (forward primer) und Umkehrprimern (reverse primer) bestehenden Primermischungen MOP-ABD und MOP-C, deren Vorwärtsprimer und Umkehrprimer degenerierte Oligonukleotide mit den in den Sequenzprotokollen SEQ ID NO. 1 bis NO. 4 gemäß der IUPAC-Nomenklatur wiedergegebenen Nukleotidsequenzen und einem sogenannten "Kopf" am 5'-Ende dieser Nukleotidsequenzen sind, wobei
- 20 die Vorwärtsprimer der Mischung MOP-ABD die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 1 aufweisen, nämlich die Nukleotidsequenzen: "Kopf"-ARAGTNYTDYCHCMRGGH, mit 3456 Degenerationen,
- die Umkehrprimer der Mischung MOP-ABD die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 2 aufweisen, nämlich die Nukleotidsequenzen: "Kopf"-
- 25 NWDDMKDITYATCMAYRWA, mit 27648 Degenerationen,
- die Vorwärtsprimer der Mischung MOP-C die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 3 aufweisen, nämlich die Nukleotidsequenzen: "Kopf"-TKKAMMSKVYTRCYHCARGGG, mit 3072 Degenerationen, und
- die Umkehrprimer der Mischung MOP-C die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 4
- 30 aufweisen, nämlich die Nukleotidsequenzen: "Kopf"-MDVHDRBMDKYMAYVYAHKKA, mit 8192 Degenerationen,

wobei "Kopf" für eine Nukleotidsequenz steht, die eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym und eine sog. Klammer-(clamp)-Sequenz (für die Stabilisierung der Schnittstellensequenz) am 5'-Ende dieser Schnittstelle umfaßt,

- Aufreinigung der erhaltenen (RT-) PCR-Amplifikate und Einsatz derselben in einem RDBH-Verfahren unter Verwendung immobilisierter RDBH-Sonden, die jeweils (je Sonde) synthetische Oligonukleotide umfassen, deren Nukleotidsequenz der retroviralen Nukleotidsequenz des retroviruspezifischen Reverse-Transkriptase-Gens der mit dem betreffenden Dot nachzuweisenden Virusart oder einem Abschnitt einer solchen retroviralen Nukleotidsequenz entspricht und keine Überlappung mit den Nukleotidsequenzen der in der PCR oder RT-PCR eingesetzten Vorwärtsprimern (forward primer) und Umkehrprimern (reverse primer) aufweist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zum Nachweis von retroviralen Nukleinsäuren in einer Probe, wobei zuerst alle Nukleinsäuren (RNA und DNA) unter Einsatz gängiger, dem Fachmann bekannten Methoden, aus dem Untersuchungsgut extrahiert werden. Hierbei wird zwischen DNA und RNA unterschieden. Für den Nachweis von bereits ins Wirtszellgenom integrierten Retroviren (Proviren) ist die Isolation von genomischer DNA ausreichend. Soll die Aktivierbarkeit bislang ruhender Retroviren, die Transkriptionsaktivität endogener Retroviren oder die Identität retroviralen Partikel untersucht werden, muß polyadenylierte Boten-RNA (mRNA) isoliert werden, die frei von genomischer DNA ist. Im Falle der Verwendung von mRNA als Ausgangsmaterial muß diese mRNA *in vitro* mittels Reverser Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden und kann dann als Matrize für die sich anschließende PCR eingesetzt werden. Diese Kombination von reverser Transkription und PCR wird gemeinhin als RT-PCR bezeichnet.

Die isolierten Nukleinsäuren werden anschließend einer Ein-Schritt PCR unter Verwendung der erfindungsgemäßen Primermischungen (MOP-ABD, MOP-C) aus retrovirusspezifischen, degenerierten, zu den hochkonservierten Regionen innerhalb des Reverse Transkriptase Gens (RT-Gens) aller bekannten humanen Retroviren korrespondierenden Oligonukleotiden (MOP, Shih et al. 1989, Donehower et al. 1990), unterworfen. Bei dieser PCR werden sämtliche retroviruspezifischen

'Reverse Transkriptase' - homologen Sequenzabschnitte, die im Untersuchungsgut enthalten sind, amplifiziert. Als Ergebnis erhält man ein Amplifikatgemisch kurzer retroviraler DNA-Fragmente, das in seiner Zusammensetzung die Häufigkeit aller nachzuweisenden retroviralen Nukleotidequenzen in dem Untersuchungsgut
5 widerspiegelt. Die Amplifikate werden entweder bereits während der PCR-Reaktion oder im Anschluß daran markiert, vorzugsweise radioaktiv, wahlweise aber ebenso auch nichtradioaktiv (z.B. mit Biotin oder Digoxigenin). Anschließend werden diese markierten Amplifikate in einem Hybridisierungsverfahren (RDBH-Verfahren) unter Verwendung von Filtermembranen oder Bio-Chips mit aufgetragenen,
10 retroviruspezifischen Oligonukleotiden als Sonden eingesetzt.

Die aus Klammer- und Schnittstellensequenz bestehende Kopf- bzw. Extensionssequenz der erfindungsgemäßen Primeroligonukleotide, hat zum einen den positiven Effekt, daß sie die Primer-Matrizen-Bindungskinetik günstig beeinflusst, so daß die in dem ersten PCR-Zyklus gebildeten PCR-Produkte in den folgenden Zyklen noch wesentlich
15 effizienter amplifiziert werden. Damit ist der Vorteil verbunden, daß retrovirale Matrizen selbst dann amplifiziert werden bzw. werden können, wenn der exakt dazu passende Primer nicht in der Primermischung vorhanden ist. Die Schnittstelle hat außerdem den Vorteil, daß sie im Bedarfsfall die Durchführung einer Klonierung erleichtert.

Grundsätzlich gilt, daß die Länge der Kopf- bzw. Extensionssequenz die halbe Länge der
20 kompletten Primernukleotidsequenz nicht überschreiten sollte.

Wesentlicher Bestandteil des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die für die Reverse Dot Blot Hybridisierung (RDBH) verwendeten RDBH-Sonden, bei denen es sich um bestimmte Mengen synthetisch erzeugter, genau definierter Nukleinsäuresequenzen aus
25 dem Reverse Transkriptase Gen derjenigen bereits charakterisierten Retroviren handelt, gegen die das Untersuchungsgut getestet werden soll. Diese retroviruspezifischen RDBH-Sonden sind auf definierten Feldern (Dots) der RDBH-Träger aufgebracht, wobei es sich sowohl um althergebrachte Filtermembranen mit Abmessungen von mehreren Zentimetern handeln kann, als auch um sogenannte Bio-Chips mit Abmessungen von
30 wenigen Millimetern ("Micro-Array-Technologie"). Im Fall von Filtermembranen werden die Sonden vorzugsweise kovalent durch UV-Crosslinking (z.B. mit der kommerziell

erhältlichen UV-Strahlungsquelle 'StratalinkerTM', Stratagene) an diesen Träger gebunden.

Bei den DNA-Chips werden Oligonukleotid-Sonden in situ synthetisiert und mit genau definierten Positionen auf einem festen Träger mit Methoden der Photolithographie (ähnlich einer Gravur) fixiert, (z.B. indem unter Verwendung von Lochmasken bestimmte Bereiche des Chips belichtet werden, um photosensitive chemische Gruppen zu aktivieren). Der Träger, vorzugsweise eine Glas- oder Nylonoberfläche von ca. 1 cm², bildet die Hybridisierungseinheit. Jede Hybridisierungseinheit kann eine sehr hohe Zahl an unterschiedlichen Oligonukleotid-Sonden (bis zu 400.000) enthalten. Dadurch wird die gleichzeitige Analyse von vielen tausend verschiedenen Sequenzen ermöglicht. Für jede Sonde werden alle Sequenz-Alternativen auf dem Chip dargestellt, eine einzige davon muß von dem zu testenden Untersuchungsgut erkannt werden. Die Hybridisierung von Sonde und Zielsequenz (im Untersuchungsgut) wird über die Messung der Amplifikatmarkerintensität nachgewiesen. Die Intensität ist proportional zum Ausmaß der Hybridisierung zwischen Sonde und Zielsequenz. Jede Zielsequenz wird nach ihrer Hybridisierungsposition auf dem Chip identifiziert. Die Technik der DNA-Chips wurde von FODOR et al. (Science 251, 767-773, 1991) entwickelt und ist im Stand der Technik bekannt (vgl. V. Oeding et al., 1999, *HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE* 1/99, S. 55-57 und G. Ramsay 1998, *NATURE BIOTECHNOLOGIE*, Vol. 16, 1998, S.40-44.).

Die Hybridisierung sollte unter hochstringenten, auf die Länge der Sonden abgestimmten Bedingungen erfolgen, und die hybridisierten Träger (Filtermembranen oder Chips) sollten anschließend unter Bedingungen hoher Stringenz gewaschen werden. Die Identität der nachweisbaren Retroviren kann – im Fall einer radioaktiven Markierung der PCR-Amplifikate - nach Exposition der Filtermembranen auf einem Röntgenfilm anhand der Signalmuster der Autoradiogramme identifiziert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht den multiplen Nachweis und die Identifizierung aller bislang bekannten humanen und/oder tierspezifischen retroviralen Nukleinsäuren/Retroviren in Zellkulturen, Zellkulturüberständen oder Körperproben oder sonstigem Untersuchungsgut biologischen Ursprungs. Voraussetzung ist lediglich,

daß bestimmte Genomabschnitte der nachzuweisenden Retroviren, nämlich die konservierten Sequenzbereiche der Reversen Transkriptase, hinsichtlich ihrer DNA-Nukleotidsequenz bekannt sind. Diese Voraussetzung ist erfüllt, da die entsprechenden Nukleotidsequenzen exogener und endogener humaner Retroviren als Genbankdaten
5 allgemein zugänglich sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren eröffnet erstmals die Möglichkeit der Bereitstellung eines universellen Retrovirus-Detektionssystems, mit dessen Hilfe in einem einzigen Experiment das gesamte Spektrum (= Expressionsmuster) aller aktiven endogenen und
10 exogenen retroviralen Nukleotidsequenzen im Untersuchungsgut (Körperprobe) erfaßbar ist. Mit diesem Detektionssystem können insbesondere auch statistisch abgesicherte Studien mit beliebig großen Patientenkollektiven durchgeführt werden und daraus gegebenenfalls bestehende Korrelationen zwischen bestimmten Erkrankungen und der Aktivität bestimmter endogener oder exogener Retroviren festgestellt werden. Im Falle
15 einer nachgewiesenen Korrelation eines bestimmten retroviralen Expressionsmusters mit einer bestimmten Erkrankung kann dieses Testsystem auch zur Früherkennung bzw. zur Abschätzung des persönlichen genetischen Risikos für eine solche Erkrankung eingesetzt werden.

20 Ein weiterer ganz entscheidenderer Vorteil des Verfahrens liegt darin, daß die erfindungsgemäßen PCR-Primer (MOP), d.h. die degenerierten Oligonukleotide der Primermischungen, die für die Amplifikation der zu identifizierenden retroviruspezifischen RT-Genabschnitte im Untersuchungsgut verwendet werden, in ihrer Sequenz nicht mit den Sequenzen der als Dot Blot Sonden eingesetzten
25 synthetischen virusspezifischen Oligomere überlappen. Die PCR-Primersequenzen tragen nämlich ungefähr zur Hälfte der endgültigen Amplifikatlänge bei. Wären diese Sequenzabschnitte auch in den Dotblot-Sonden enthalten (vgl. Herrmann und Kalden, 1994), würde dies zu erheblichen Einschränkungen in der Aussagekraft des Tests führen, da die Amplifikate dann zu einem gewissen Maße mit allen Dotblot-Sonden auf der
30 Filtermembran hybridisieren würden. Es ist der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens, daß dieser unerwünschte Effekt durch die Verwendung synthetischer,

präzise definierter, homogener Oligonukleotidpräparationen für Vorwärts- (forward) und Umkehrprimer (reversed primer) einerseits und für die RDBH-Sonden andererseits verhindert wird.

- 5 Die Nukleotidsequenzen aller bislang charakterisierten exogenen und endogenen Retroviren (HERV) sind in Genbanken publiziert. Von ihnen können entsprechende Nukleotidsequenzen für die Synthese virusspezifischer Oligomere als Dot Blot-Sonden abgeleitet werden. Prinzipiell können entsprechende Oligomere all dieser Sequenzen auf eine einzige Filtermembran aufgedotet werden. Demzufolge ist es möglich, ein
- 10 Untersuchungsgut in einem einzigen Experiment auf das gesamte Spektrum bislang bekannter Retroviren zu testen. Im Vergleich zum Stand der Technik, demgemäß für die Identifizierung eines jeden in einer Probe vermuteten Virus ein eigener Diagosetest, insbesondere serologischer Test unter Verwendung eines speziellen Antikörpers, durchgeführt werden muß, stellt das erfindungsgemäße Verfahren somit einen
- 15 bedeutenden Fortschritt dar.

Aufgrund der bekanntermaßen hohen Sensitivität der PCR und der Möglichkeit der wiederholten Reamplifikation von PCR-Produkten wird mit dem erfindungsgemäßen Verfahren zudem eine Nachweisgrenze erreicht, die von kaum einem anderen Testsystem

20 erreicht wird.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht der "Kopf"- oder Extensionsabschnitt der erfindungsgemäßen Primernukleotide aus der Nukleotidsequenz GAAGGATCC, wobei die Nukleotidfolge GAA eine sogenannte

25 'clamp' (=Klammer) darstellt und die Nukleotidfolge GGATCC die Schnittstelle für das Restriktionsenzym BamHI repräsentiert. Diese Kopf- bzw. Extensionssequenz hat sich in der Praxis sehr gut bewährt. Prinzipiell kann die Kopfsequenz aber aus jeder beliebigen Nukleotidsequenz bestehen, vorausgesetzt daß diese die Primer-Annealing-Kinetik nicht negativ beeinflußt.

Die Nukleotidsequenzen der synthetischen Oligonukleotide der RDBH-Sonden sind vorzugsweise so gewählt, daß sie zu der retroviralen Nukleinsäureregion des Reverse-Transkriptase-Gens zwischen den hoch konservierten Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L oder zu einem Abschnitt dieser Region korrespondieren, d.h. damit
5 übereinstimmen und/oder (im Experiment) hybridisieren können.

Da die Effizienz einer Oligonukleotid-Synthese mit der Länge des zu synthetisierenden Oligonukleotids abnimmt, ist eine Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens vorgesehen, bei der als immobilisierte RDBH-Sonden jeweils (d.h. je Sonden bzw. je
10 Dot) eine Mischung aus äquimolaren Mengen zweier im Vergleich kurzkettiger synthetischer Oligonukleotide eingesetzt werden. Diese korrespondieren zusammen bzw. hintereinandergereiht zu einem längeren, vorzugsweise etwa 90 Basenpaare (bp) langen Abschnitt der Nukleinsäureregion des Reverse-Transkriptase-Gens zwischen den hoch konservierten Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L.

15 In einer Ausführungsform, die sich in der Praxis sehr gut bewährt hat, sind diese beiden kurzkettigen Oligonukleotide annähernd gleich groß bzw. gleich lang, und umfassen vorzugsweise ca. 45 Basenpaare.

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen und dazugehörigen
20 Figuren und Tabellen näher erläutert.

Die verwendeten Abkürzungen bedeuten:

BaEV = Baboon endogenes Retrovirus des Pavians;

ERV = endogenes Retrovirus,

25 ERV9 = endogenes Retrovirus Typ 9.

GaLV = Gibbonaffen Leukämie Virus;

HERV = humanes endogenes Retrovirus;

HIV = humanes Immundefizienz Virus;

HML = humane Maus Mammatumovirus-ähnliche Sequenz;

30 HPLC = High Performance Liquid Chromatography

HRV5 = humanes (exogenes) Retrovirus Typ 5;

HTLV-1 = humanes adultes T-Zellen-Leukämie-Virus Typ 1;

LINE = langes, disperses (verstreut liegendes) DNA-Sequenzelement;

MMTV = Mause Mammatumortumor-Virus;

MoMuLV = Moloney Mäuse LeukämieVirus;

- 5 MOP = Vorwärtsprimer (forward primer) und Umkehrprimer (reversed primer)
umfassende Primermischung aus degenerierten Oligonukleotiden

MPMV = Mason Pfizer Affen Virus;

PCR = Polymerase-Ketten-Reaktion

PERV = endogenes Schweine-Retrovirus (porcine endogenous retrovirus) ;

- 10 PBMNC = periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells);

RDBH = Reverse Dot Blot Hybridisierung

RT =Reverse Transkriptase

Es zeigen:

- 15 Tabelle 1: erfindungsgemäße Retrovirus-Typ-ABD- und -Typ-C-spezifische
Primermischungen MOP-ABD und MOP-C, die jeweils Vorwärtsprimer
(forward primer) und Umkehrprimer (reverse primer) umfassen und
degenerierte Oligonukleotide darstellen. Zur Beschreibung der degenerierten
Oligonukleotidsequenzen ist der standardisierte Einzelbuchstaben-
20 abkürzungscode der IUPAC Nomenklatur verwendet worden (siehe *European
Journal of Biochemistry* 150: 15,1985). Sowohl die Vorwärtsprimer (forward
primer) als auch die Umkehrprimer (reverse primer) sind, gemäß der IUPAC
Konventionen und bezogen auf den DNA-Strang, in 5'-3' Richtung
dargestellt. Der Grad der Degeneration, das heißt mit anderen Worten die
25 Anzahl der verschiedenen, bei der Synthese erhältlichen möglichen konkreten
Ausführungsformen dieser Primer, ist jeweils in Form der theoretisch
errechneten Anzahl verschiedener Oligonukleotide angegeben.

- 30 Tabelle 2: Immobilisierte synthetische retroviruspezifische Oligonukleotid-Sonden zur
Herstellung von Dot-Blot Membranen. Für jeden Fleck bzw. Dot wurde eine
Mischung aus äquimolaren Mengen der beiden Partner eines

Oligonukleotidpaares, das zu einem 90 bp langen Abschnitt einer retroviruspezifischen Reversen Transkriptase korrespondiert, hergestellt. Jeweils 100 Picomole dieser Mischungen wurden in der dem abgebildeten Code entsprechenden Anordnung auf die Membran aufgetragen. Zur internen
5 Standardisierung der Hybridisierung und Autoradiographie wurde eine Verdünnungsreihe menschlicher genomischer DNA (8E - 8H) und von Oligonukleotid-Primer-Mischungen (8I - 8L) auf die Filter aufgebracht. Für jede auf dem Filter eingesetzte Oligonukleotidsequenz ist, soweit verfügbar, die Genbank- Zugriffsnummer und der Erstautor angegeben.

10

Tabelle 3: Klassifizierung von retroviruspezifischen Oligonukleotid-Dot-Blot-Sonden:

Von 61 repräsentativen Mitgliedern aller bekannten humanen exogenen und endogenen Retroviren wurde die Nukleotidsequenz des jeweiligen Reverse Transkriptase Gens in dem Bereich zwischen den hoch konservierten
15 Domainen V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L für die Synthese von Dot-Blot-Sonden herangezogen (Shih et al. 1989, Donehower et al. 1990). In dem hier dargestellten Experiment wurden 21 retrovirale Nukleotidsequenzen vom Typ ABD (HERV-K Superfamilie), 19 retrovirale Nukleotidsequenzen vom Typ C, 1 retrovirale Nukleotidsequenz vom Typ D und 7 Nukleotidsequenzen mit Verwandtschaft zum humanen Foamy Virus eingesetzt. Ferner wurde eine
20 humane LINE-1 Sequenz (3L) und 6 exogene humane Retroviren (6E - 6J), sowie fünf Sonden, die zu je einem tierischen Säuger-C-Typ-Retrovirus korrespondieren und eine Sonde, die zu einem tierischen Säuger-B-Typ-Retrovirus korrespondiert (7E - 7J), getestet.

25 Sterne markieren mit HERV Transkripten verwandte Nukleotidsequenzen, die in Patienten mit Multipler Sklerose und Patienten mit systemischer Lupus-Erythematose gefunden wurden.

FIG. 1. Lokalisierung von konservierten Aminosäureabschnitten in der
30 aminoterminalen Genregion der Reversen Transkriptase von Retroviren und Retrotransposons. Die Homologie Kernregionen V L P Q G und Y M/V D D

I/V/L L wurden für die Ableitung und Herstellung der degenerierten Oligonukleotide der erfindungsgemäßen Primermischungen (MOP-ABD bzw. MOP-C) eingesetzt.

5 FIG. 2. Schematische Darstellung des erfindungsgemäßen RT-PCR/RDBH Verfahrens.

FIG. 3. HERV Expressionsmuster in humanen PBMNCs eines gesunden Blutspenders.

10 Die Durchführung der Reversen Dot-Blot-Hybridisierung (RDBH) erfolgte unter Standardbedingungen mit DNA-Fragmenten, die mit den erfindungsgemäßen Primermischungen aus degenerierten Oligonukleotiden, nämlich MOP-ABD (Tabelle A) bzw. MOP-C (Tabelle B) bzw. der Kombination MOP-ABD/MOP-C (Tabelle C) amplifiziert worden waren.

15

FIG. 4. HERV Expression in humanen PBMNCs nach Zugabe eines klonierten DNA-Fragments, das ein PERV RT-Gen enthält. Weniger als 10 Kopien einer endogenen Schweineretrovirus (PERV) Typ A DNA (Patience et al. 20 1997) konnten unter standardisierten Versuchsbedingungen noch nachgewiesen und identifiziert werden (Tafel A, Filter Code 7F). Unter den angewendeten Stringenzbedingungen wurde keine Kreuzhybridisierung von HERVs mit schweinespezifischen Amplifikationsprodukten, die von einer Schweine-DNA-Matrize gewonnen wurden, beobachtet (Tafel B).

25

Beispiel 1: RNA Präparation

Von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMNC = peripheral blood mononuclear cells) eines gesunden Blutspenders wurde die gesamt-RNA gemäß dem Guanidin
30 Isothiocyanate/Cäsium Chlorid (GIT/CsCl) Ultrazentrifugations-Protokoll von Sambrook et al. (1989) extrahiert und in mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem

destillierten Wasser gelöst. Anschließend wurde die mRNA mit herkömmlichen Methoden angereichert, z.B. unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Anreicherungskits 'Dynabeads™ paramagnetic Partikel' nach den Anweisungen des Herstellers (DynaI, Hamburg, Germany). Die Nukleinsäure-Konzentration wurde mittels

5 Spektrophotometrie bei 260 nm bestimmt. Zur Überprüfung auf etwaige Kontaminationen mit genomischer DNA wurden 50 ng von jeder mRNA-Präparation direkt, d.h. ohne zunächst einer reversen Transkription unterworfen worden zu sein, in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) unter Verwendung der erfindungsgemäßen Primermischungen aus degenerierten Oligonucleotiden (MOP) eingesetzt. Nur solche

10 Präparationen, die keine DNA-Spuren aufwiesen, wurden für die eigentliche PCR verwendet. Diejenigen Präparationsansätze, bei denen eine DNA-Kontamination nachweisbar war, wurden so lange mit 100 Einheiten/µg RNase-freier DNase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) in 100 mM Natrium-Azetat pH 5.0, 5 mM MgSO₄ behandelt, bis die Kontroll-PCR ein negatives Ergebnis lieferte.

15

Beispiel 2: Herstellung von erfindungsgemäßen Primermischungen MOP-ABD und MOP-C für die PCR.

In Tabelle 1 sind bevorzugte MOP-ABD und MOP-C-Primermischungen unter

20 Verwendung der in Fachkreisen bekannten und geläufigen IUPAC-Nomenklatur dargestellt. Jede der Primermischungen enthält eine Mehrzahl verschiedener Vorwärtsprimer (forward primer) und Umkehrprimer (reverse primer): Die Vorwärtsprimer (forward primer) der Primermischung MOP-ABD weisen die allgemeine Nukleotidsequenz GAAGGATCCARAGTNYTDYCHCMRGGH auf, die 3456

25 Degenerationen, d.h. 3456 verschiedene konkrete Nukleotidsequenzen umfaßt. Die Umkehrprimer (reverse primer) der Primermischung MOP-ABD weisen die Nukleotidsequenz GAAGGATCCNWDDMKDITYATCMAYRWA auf, die 27648 Degenerationen, d.h. 27648 verschiedene konkrete Nukleotidsequenzen umfaßt. Die Vorwärtsprimer (forward primer) der Primermischung MOP-C sind durch die allgemeine

30 Nukleotidsequenz GAAGGATCCTKKAMMSKVYTRCYHCARGGG gekennzeichnet, die 3072 Degenerationen, d.h. 3072 verschiedene konkrete Nukleotidsequenzen umfaßt,

und die Umkehrprimer (reverse primer) der Primermischung MOP-C weisen die Nukleotidsequenz GAAGGATCCMDVHDRBMDKYMAYVYAHKKA auf, die 8192 Degenerationen, d.h. 8192 verschiedene konkrete Nukleotidsequenzen umfaßt.

- Diese Primer-Nukleotidsequenzen korrespondieren zu den hoch konservierten
- 5 Homologie Kernregionen V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L innerhalb des Reverse Transkriptase (RT) Gens aller bekannten humanen endogenen und exogenen Retroviren (siehe Fig. 1 und die Publikationen von Xiong und Eickbush 1990, Shih et al. 1989 und Donehower et al. 1990). Der als "Kopf" bezeichnete Anfang der Primernukleotidsequenzen an dem 5' Ende der jeweiligen retroviruspezifischen Core-
- 10 Homologie-Region, nämlich die Nukleotidfolge GAAGGATCC ist eine Extensionssequenz, die aus der sogenannten "clamp"-Sequenz GAA und der *Bam*HI Restriktionsstelle GGATCC besteht.

- Anstelle der hier beschriebenen "clamp"-Sequenz und der hier beschriebenen *Bam*HI Restriktionsstelle kann auch eine andere "clamp"-Sequenz und/oder eine andere
- 15 Schnittstelle für ein Restriktionsenzym zur Erzeugung der "Kopf" bzw. Extensionssequenz der jeweiligen Primer verwendet werden. Grundsätzlich gilt allerdings, daß die Länge dieser "Kopf" bzw. Extensionssequenz nicht mehr als die Hälfte der Primergesamtlänge betragen sollte.

- 20 Die Primermischung MOP-ABD erlaubt die separate Amplifikation der Retroviren vom Typ A, B und D, und die Primermischung MOP-C erlaubt die separate Amplifikation der Retroviren vom Typ C. Beide Primermischungen können ohne weiteres kombiniert werden und ermöglichen damit die Amplifikation aller Retrovirustypen (Typ A, B, C, und D).

25

Beispiel 3: Herstellung der Sonden für die Reverse Dot Blot Hybridisierung (RDBH)

- Aminosäuresequenz-Vergleiche haben gezeigt, daß die für die Reverse Transkriptase
- 30 kodierenden Gene aller Retroviren und der meisten Retroelemente hoch konservierte Homologie Kernregionen aufweisen (Poch et al. 1989, Shih et al. 1989, McClure 1993,

Donehower et al. 1990, Xiong and Eickbush 1990). Zwei der meist konservierten Aminosäuresequenzabschnitte sind die Aminosäuremotive V L P Q G und Y V/M D D I/V/L L (Fig. 1). Der Sequenzbereich zwischen diesen Motiven umfaßt etwa 90 Basenpaare (d.h. ist etwa 90 bp lang) und weist eine deutlich geringere Homologie innerhalb der verschiedenen Retrovirus-Familien auf. Dieser Bereich wurde zur Herstellung von retrovirusspezifischen Sonden für die RDBH herangezogen.

Dabei wurde wie folgt vorgegangen: zunächst wurden allgemein zugängliche Nukleotidsequenz-Datenbanken nach Nukleotidsequenz durchsucht, die mit der Nukleotidsequenz der Reversen Transkriptase (RT) verwandt sind. Sequenzen von exogenen und endogenen Retroviren wurden gemäß der geltenden Nomenklatur klassifiziert und hinsichtlich ihrer RT-Homologie weiter in Unterklassen untergliedert (Daten hier nicht dargestellt). Einige bisher unpublizierte HERV-Sequenzdaten wurden freundlicherweise von Martin Herrmann (1998) zur Verfügung gestellt, einige wurden selbst charakterisiert. Von allen bekannten Retrovirus-Familien wurden repräsentative Mitglieder ausgewählt (Tab. 3) und aus deren jeweiligem RT-Gen, jeweils im Bereich zwischen den hoch konservierten RT-Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L, jeweils ein ca. 90 bp langes Fragment isoliert und als Vorlage zur Synthese entsprechender RDBH-Sonden verwendet. Da die Effizienz einer Oligonukleotid-Synthese mit der Länge des zu synthetisierenden Oligonukleotids abnimmt, wurden jeweils anstelle eines 90 pb langen Oligonukleotids (90-mer) zwei 45 bp lange Oligonukleotide (45-mers) synthetisiert und als Paar eingesetzt. Jeder Dot (Fleck) des auf die hier beschriebene Weise hergestellten Dot-Blots entspricht einer äquimolaren Mischung aus gleichen Anteilen eines Paares von 45mers aus der Gruppe der Paare, die in Tabelle 2 aufgelistet sind.

25

Beispiel 4: Herstellung von Reverse-Dot-Blot-Membranen für die RDBH

Retrovirus-spezifische Oligonukleotide, die zu einem 90 bp langen Fragment der hoch konservierten Domäne des RT-Gens korrespondieren, wurden synthetisiert und mittels HPLC gereinigt. Für jede zu testende retrovirale Nukleotidsequenz wurden äquimolare Mengen der beiden Partner eines gemäß Beispiel 3 hergestellten Paares von 45-mer

30

Oligonucleotiden zusammengemischt und 100 Picomole dieser Paarmischung wurden in 5x SSC (1x SSC = 0,15M NaCl plus 0,015 M Natriumcitrat) gelöst und anschließend manuell oder maschinell, mit Hilfe einer handelsüblichen Dot Blot Apparatur (beispielsweise Minifold I dot blotter SRC96D von Schleicher & Schuell, Dassel Germany), auf eine handelsübliche Filtermembran (beispielsweise eine ZETAprrobeTM GT blotting Membran von BioRad, Hercules CA USA) aufgetropft. Die Filter wurden in 2x SSC äquibriert, die Oligonucleotide wurden irreversibel immobilisiert, vorzugsweise mittels UV-Crosslinking (beispielsweise mit dem kommerziell erhältlichen UV-Strahler StratalinkerTM von Stratagene, La Jolla, CA USA), und die Filter wurden anschließend an der Luft getrocknet.

Nach erfolgter Hybridisierung der Amplifikat-DNA an die kovalent auf den Membranen gebundenen RDBH-Sonden kann gebundene Amplifikat-DNA von der Dot-Blot Membran durch alkalische Denaturierung wieder gelöst werden und bei Bedarf reamplifiziert werden, um ausreichende Mengen an doppelsträngiger DNA z.B. für eine Klonierung und nachfolgende Sequenzanalyse der betreffenden Amplifikate zu erhalten.

Beispiel 5: Reverse Transkription und Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Von jedem Versuchsansatz wurden 500 ng DNA-freie mRNA in 50 µl einer Lösung aus 20 mM Tris/HCl pH 8,4, 10 mM Dithiothreitol (DTT), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM von jedem Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP), 10 Einheiten RNasin (Promega) 30 pmol Random Hexamere Oligonucleotides (Promega) und 20 Einheiten an MLV Reverse Transkriptase (GIBCO-BRL) bei 37 °C für 1 Stunde revers transkribiert. Anschließend wurden die Ansätze denaturiert, beispielsweise durch Hitzebehandlung bei 95°C für 5 Min., und bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

Für die erfindungsgemäßen MOP-PCRs (mit MOP-ABD und/oder MOP-C) wurde jeweils ein Zwanzigstel Volumen (1/20) der cDNA-Reaktion in 50 µl einer Lösung aus 10 mM Tris/HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,001% Gelatine, 50 pmoles der betreffenden erfindungsgemäßen Primermischung(en) aus degenerierten Oligonucleotiden, 0,25 mM von jedem Desoxynukleosidtriphosphat, und 1,25 Einheiten Taq Polymerase (GIBCO-BRL) amplifiziert. Die Versuchsansätze wurde auf Eis

zubereitet und mit 50 µl Mineralöl (Sigma) überschichtet. Die Amplifikation wurde in einem handelsüblichen DNA-Thermal-Zykler (beispielsweise der Firma Perkin Elmer Cetus) unter Verwendung der fachbekannten "Hot-Start"-Methode durchgeführt, wobei 30 Zyklen durchlaufen wurden, die jeweils die folgenden Parameter aufwiesen: 30 Sek. bei 94 °C, 4 Min. bei 50 °C und 1 Min. bei 72 °C. Zum Abschluß wurde ein Extensionsschritt bei 72°C für 7 Min. durchgeführt. Die Annealingzeit, d.h. die Zeit zur Doppelstrangbildung, betrug vier Minuten, um zu gewährleisten, daß die überwiegende Zahl der in der erfindungsgemäßen Primermischung enthaltenen (degenerierten Oligonukleotid-) Primer die zu ihnen homologen Matrizen finden. Die
5 Extensionssequenz der erfindungsgemäßen Primer hat einen stabilisierenden Effekt auf die Primer-Matrizen-Bindungskinetik, so daß die in dem ersten PCR-Zyklus gebildeten PCR-Produkte in den folgenden Zyklen wesentlich effizienter amplifiziert werden. Damit geht der Vorteil einher, daß retrovirale Matrizen selbst dann amplifiziert werden (können), wenn der exakt dazu passende Primer nicht in der erfindungsgemäßen
10 Primermischung vorhanden ist. Darüber hinaus ist eine schnelle Klonierung der Amplifikationsprodukte z.B. für eine Sequenzüberprüfung oder für die Charakterisierung neuer RT-verwandter Nukleotidsequenzen möglich.

Die Reaktionsbedingungen für die PCR wurden im Hinblick auf die Primermenge, die Annealingzeit (Doppelstrangbildungszeit) und die Annealingtemperatur
20 (Doppelstrangbildungstemperatur) optimiert, um eine optimale Produktausbeute zu erzielen..

Um Produkt-Kontaminationen aus vorangegangenen PCR-Experimenten und etwaige Spuren von genomischen DNA-Kontaminationen in den verwendeten Lösungen nachzuweisen, wurde eine Kontrollreaktion durchgeführt, bei der die Matrizen
25 weggelassen wurden. Die Amplifikationsprodukte wurden auf präparativen 2.5 % TBE Agarose Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethydiumbromid angefärbt. Banden mit einer Größe zwischen 100 und 150 bp, die mit den amplifizierten retroviralen RT-Nukleotidsequenzen korrespondierten, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung eines handelsüblichen Reinigungssets
30 (beispielsweise des GENE CLEAN II kits von BIO 101 Inc., Vista CA USA) aufgereinigt. Für die RDBH wurden ca. 50 ng der gereinigten Fragmente mit [α-

³²P]dATP (3000 Ci/mmol) markiert. Die Markierung wurde mittels des Megaprime DNA labelling kit (Amersham Pharmacia Biotech, England) durchgeführt, sie kann aber selbstverständlich ebenso gut auch mit Hilfe anderer gebräuchlicher Markierungsverfahren erfolgen.

5

Beispiel 6: Reverse Dot Blot Hybridisierung (RDBH)

Sowohl für den Nachweis als auch für die Identifikation der amplifizierten Produkte wurde die Methode der RDBH angewendet. Diese RDBH-Methode ermöglicht eine strikte Diskriminierung (Unterscheidung) von PCR-Produkten, so daß gegebenenfalls vorhandene falsch amplifizierte Nukleotidsequenzen, die keine Verwandtschaft zu Nukleotidsequenzen von retroviralen RT-Genen aufweisen, ohne Bedeutung sind. Die hohe Stringenz der RDBH wird durch den Einsatz der erfindungsgemäßen synthetischen HERV-spezifischen Oligonukleotide erreicht, die als RDBH-Sonden auf die Dot Blot Filtermembran aufgebracht sind. Der erfindungswesentliche Vorteil dieser RDBH-Sonden- Oligonukleotide besteht darin, daß sie keine der Nukleotidsequenzen enthalten, die die degenerierten Oligonukleotide der erfindungsgemäßen PCR-Primer-mischungen MOP-ABD und MOP-C aufweisen (vgl. z.B. Tab. 1) und sich dadurch grundsätzlich von diesen PCR-Primer-Oligonukleotiden unterscheiden. Dieser grundsätzliche Unterschied zwischen den RDBH-Sonden-Oligonukleotiden und den PCR-Primer-Oligonukleotiden gewährleistet, daß eine Hybridisierung zwischen einer RDBH-Sonde und einem PCR-Amplifikat nur dann stattfindet, wenn die zwischen den beiden Primern befindliche Nukleotidsequenz mit dem betreffenden RDBH-Sonden-Oligonukleotid korrespondiert, d.h. wenn diese Nukleotidsequenz mit dem betreffenden RT-Nukleotidsequenzabschnitt identisch ist oder sich nur in wenigen Nukleotiden (n=3) unterscheidet. Im Idealfall sollten die hybridisierenden DNA-Sequenzen völlig identisch sein. In der Praxis unter den gegebenen Hybridisierungsbedingungen sind Unterschiede von zwei bis drei Nukleotiden tolerierbar. Infolgedessen können unter hoch stringenten Bedingungen selbst eng verwandte retrovirale Nukleotidsequenz noch voneinander unterschieden und eindeutig identifiziert werden.

Zur Vermeidung von Kreuz-Hybridisierungen wurden die optimalen Stringenzbedingungen für die RDBH bestimmt, indem Hybridisierungstemperatur, Waschtemperatur und Salzkonzentrationen variiert wurden. Die Prähybridisierung der Reverse-D-Blot-Filters wurde in verschweißten Plastiktaschen in 0,25 M Na₂HPO₄ pH 7,2, 7% Natriumdodecylsulfate (SDS), 1 mM EDTA bei 50 °C für mindestens 3 Std. durchgeführt. Für die eigentliche Hybridisierung wurden dieselben Lösungen mit 5x10⁵ Cpm der markierten PCR-Amplifikate pro ml Hybridisierungsvolumen versetzt und für 16 Std. unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Membranen zweimal in 40 mM Na₂HPO₄, pH 7,2, 5% SDS, 1 mM EDTA und zweimal in 40 mM Na₂HPO₄, pH 7,2, 1% SDS, 1 mM EDTA, (jeweils ca 30 Min.) gewaschen. Die Untersuchung und Auswertung der Reaktion erfolgte mittels Autoradiographie.

Beispiel 7: Analyse des HERV-Transkriptionsmusters in humanen PBMCs mittels des erfindungsgemäßen PCR/RDBH-Verfahrens

Gemäß dem in Fig. 2 dargestellten Verfahrensschema wurde zunächst aus humanen PBMCs die Gesamt-RNA wie in Beispiel 1 beschrieben mittel gängiger Isolationstechniken extrahiert. Diese Gesamt-RNA wurde zunächst einer RT-PCR/RDBH unter Verwendung der erfindungsgemäßen Primermischung MOP-ABD unterworfen. Dabei wurden nahezu ausschließlich Typ B-verwandte HERVs, d.h. Mitglieder der HERV-K Überfamilie, nachgewiesen (Fig. 3A). Die meisten Transkripte stammten von Mitgliedern der HERV-K -Untergruppen HML-2, -3, -4, und -6. Darüber hinaus wurden Signale von HERV-KC4 verwandten Elementen (8A, 8B) und von einer weiteren HERV-K verwandten Nukleotidsequenz, die keiner der HML-Untergruppen zugeordnet werden konnte (5F), gefunden. Das beobachtete Expressionsmuster steht in Übereinstimmung mit bereits publizierten Studien, die im Ergebnis eine differenzierte Expression von HML-Elementen in humanen Geweben feststellten (Medstrand et al. 1993, Andersson et al. 1996). Außerdem wurden geringe Mengen des mit dem humanen Foamy Virus verwandten Elements HERV-L gefunden, womit die hohe Spezifität der MOP-ABD Primermischung für Typ- ABD-verwandte Elemente gezeigt ist.

Parallel zu diesem Versuch wurde die Gesamt-RNA von PBMNCs einer RT-PCR/RDBH unter Verwendung der erfindungsgemäßen Primermischung MOP-C unterworfen. Im Unterschied zur MOB-ABD-Primermischung ist die MOP-C-Primermischung nicht nur zum Priming von Typ- C-verwandten Nukleotidsequenz geeignet, sondern amplifiziert auch HERV-K-verwandte Elemente der HML-2, HML-4, und HML-6 Untergruppen. Es war eine starke Expression von HERV-E4-1-verwandten Elementen (2H und 2I), von humanem Foamy Virus verwandten HERV-L Elementen (1E bis 1K) und von ERV9-verwandten HERVs (4E bis 4G, und 4I) nachweisbar. Obwohl in allen RDBH-Reaktionen die gleichen Mengen an radioaktiv markierten PCR-Amplifikaten eingesetzt wurden, ergaben die auf den Membranen vorhandenen genomischen DNA-Sonden (8E bis 8H) nach der Hybridisierung mit MOP-C erzeugten PCR-Amplifikaten wesentlich stärkere Signale als nach der Hybridisierung mit MOP-ABD erzeugten PCR-Amplifikaten. Diese Befunde weisen darauf hin, daß das humane Genom signifikant mehr Kopien von Typ C-verwandten HERV-Elementen als von Typ-B-verwandten HERV Elementen enthält.

Zum Nachweis aller retroviralen Nukleotidsequenzen in einem einzigen Experiment wurden die MOP-ABD- und die MOP-C-Primermischungen in Kombination aus äquimolaren Mengen in einem erfindungsgemäßen PCR/RDBH-Verfahren eingesetzt. Dieses Experiment resultierte in einer überwiegenden Amplifikation von Typ C-verwandten Nukleotidsequenzen, während die ABD-Typ-Sequenzen unterrepräsentiert blieben (Daten hier nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurden separate PCR Verfahren mit MOP-ABD-Primermischungen einerseits und MOP-C-Primermischungen andererseits durchgeführt und die gereinigten Amplifikationsprodukte beider Verfahren in äquimolaren Mengen kombiniert. Mit dieser Amplifikationsproduktkombination wurde dann die RDBH durchgeführt. Dabei wurde das in Fig. 3C dargestellte Signalmuster erhalten, das der theoretischen Kombination der Signalmuster der RDBH-Verfahren mit MOP-ABD- Amplifikaten gemäß Fig. 3A einerseits und mit MOP-C-Amplifikaten gemäß Fig. 3B andererseits entspricht. Dieser Befund zeigt, daß das erfindungsgemäße PCR/RDBH-Verfahren insbesondere als qualitatives Nachweisverfahren überragend gut geeignet ist.

Beispiel 8: Nachweis der Sensitivität des erfindungsgemäßen PCR/RDBH-Verfahrens

Zur Überprüfung der Sensitivität des erfindungsgemäßen PCR/RDBH-Verfahrens im Hinblick auf einen angestrebten praktischen Einsatz in der Routinediagnostik, z.B. zum
5 Nachweis bzw. Ausschluß einer etwaigen Interspezies-Transmission von PERV mit Xenotransplantaten, wurden Verdünnungsreihenexperimente unter Verwendung von cDNA aus humanen PBMNCs und abnehmenden Konzentrationen eines klonierten DNA-Fragments, das eine PERV RT -kodierende Region enthält (Takeuchi et al. 1998), durchgeführt. Unter standardisierten Versuchsbedingungen war in der cDNA, die aus
10 25 ng humaner PBMNC mRNA gewonnenen worden war, selbst noch die so geringe Menge von 10 Kopien PERV DNA nachweisbar (siehe FIG. 4A, Filter Code 7F).

Irgendwelche Kreuzhybridisierungen zwischen humanspezifischen Amplifikaten und PERV-spezifischen RDBH-Sonden wurden nicht beobachtet (vgl. Fig. 3C, Filter Code
15 7F). Auch bei der Durchführung des PCR/RDBH-Verfahrens mit reiner Schweine-DNA als PCR Matrize (FIG. 4B) waren keine Kreuzhybridisierungen zwischen den Schweine-Amplifikaten und den humanen endogenen oder exogenen retroviralen Nukleotidsequenzen nachweisbar. Diese Ergebnisse sind ein starkes Indiz für die sehr hohe Interspezies-Spezifität des erfindungsgemäßen PCR/RDBH-Verfahrens.

20 Die in dem hier dargestellten Versuch gewonnenen Ergebnisse, nämlich das mit der murinen Typ-C Retrovirus-spezifischen Sonde (7 I) erhaltene schwache Signal, weisen überraschenderweise darauf hin, daß in der Schweine-Genom-DNA ebenfalls PERVs mit einer Homology zu MoMuLV enthalten sind. Weitere Ergebnisse dieses Versuchs, nämlich die Beobachtung eines schwachen Signals mit humanen DNA-Sonden (8E, 8F)
25 weisen ebenfalls überraschend darauf hin, daß auch das humane Genom möglicherweise PERV verwandte Nukleotidsequenzen enthält, die kein Pendant auf der eingesetzten Dot Blot Membran haben und infolgedessen vermutlich bisher noch uncharakterisiert sind. Dieser Befunde verdeutlichen den außerordentlichen Vorteil des erfindungsgemäßen PCR/RDBH-Verfahrens, nämlich die Ermöglichung des Auffindens, der Isolierung und
30 Klonierung von bisher unbekannten DNA -Fragmenten.

Tabelle 1

Primer		Nukleotidsequenz	Degeneration
MOP-ABD	Vorwärts-	<u>GAAGGATCC</u> ARAGTNYTDYCHCMRGGH	3456
	Umkehr-	<u>GAAGGATCC</u> CNWDDMKDVTATCMAYRWA	27648
MOP-C	Vorwärts-	<u>GAAGGATCC</u> CTKKAMMSKVYTRCYHCARGGG	3072
	Umkehr-	<u>GAAGGATCC</u> MDVHDBMDKYMAYVYAHKKA	8192

Tabelle 2

Code	Quelle	Sonde	Oligonukleotidsequenz (5' -> 3')
1A	U35102, Medstrand et al. 1993	HML-1	ATGCTAANTAGCCCAACTGTTGTTAAACTTATGTGCAGAAAGCTA ATGTTAAATAGCCCAACTATTTGTCAAACCTATGTTGGGAAAGTT
1B	S77579, Levebvre et al. 1985	SEQ29	ATGTTAAATAGCCCAACTATTTGTCAAACCTATGTTGGGAAAGTT ATTAAGCCAGTTAGAGAACAGTTTAAATAATGTTATAGTATTCAT
1E	G895838, Cordonnier et al. 1995	HERV-L	TATATCAACTCTCGGCTTTGTGTATATCTTTATTCAGAGTGAT CTTGATCACTTTTTCACCTGCCACAAGATATCACACTGGTCCAATTAC
1F	Herrmann 1998	SEQ39	GTATATCAACTCTCGAGCTTTGTGTATATCTTTATTCAGAGATA CCTTGATCACTTTTTCACCTCTGCAAGATATCATGCTGGTCCATTAC
1G	Herrmann 1998	SEQ40	TTAATCAACTCTAGCTTTGTATCATATCTTTATTCGGAGAGAC CCTGATCGCTTTTGGCTTCGCAAGATATCACACTGGGTTTGTTA
1H	Herrmann 1998	SEQ45	TATATCAGTTATCTGGCTTTGTGACGTAATCTTTATTTGGAGAGAT CTAGATAACTTTTCACTTCCACAAGATATCACACTGGTCCACTAC
1I	Herrmann 1998	SEQ48	TATATCAACTCTCGAGCTTTGTGTATATCTTTATTCAGAGAGATC TTGATCACTTTTGTGCTTCCACAAGATATCACACTGATGCTTACAT
1J	Herrmann 1998	SEQ51	TGTATCAACTCTCTGGCTTTGTGTATATCTTTATTCAGAGAGATC CTTGATCGCTTTTGTGCTTCCACNAGATATCACACTGGTCCATTAT
1K	Herrmann 1998	SEQ58	TATATCAACTCTCCAGTTTGTGTATATCTTTATTCAGAGAGATC CTTGATCACTTTTGTGCTTCCACAAGATATCACACTGGGCTTATAC
2A	M14123 Ono et al. 1986	HERV-K10	ATGCTTAATAGTCCAACTATTTGTGACAGCTTTTGTAGTCCAGCT CTTCAACCACTGAGAGAAAGTTTTCAGACTGTTATATATTTATCAT
2B	U87592 Zsiros et al. 1998	SEQ U87592	ATGCTTAATAGTCCAACTATTTGTGACAGCTTTTGTAGTCCAGCT CTTCAACCACTGAGAGAAAGTTTTCAGACTGTTATATATATTTATCAT
2E	U12970 Haltmeyer et al. 1995	pCRTK1	TTTAAAACTCCCTACCTTTTGGGGAAGCCCTCCAAACAGGAT CTTATACCACTTCTGAGCCAGTAACCTCACTGCACTCTTCTCCAG
2F	U12989 Haltmeyer et al. 1995	pCRTK6	TTTAAAAATTCGCGCCACCTTTTGGGGAAGCCCTCCAAACAGAT CTTCTACCATTTCTGAGCCAGTCCCTTAACTGTAACTCTTCTTCA
2H	M10976 Repaske et al. 1985	HERVE41	TTCAAGAACTCCCGCCACCATCTTTGGGGAAGCCGTTGGCTCGAGA CCTCCAGAAGTTTCCCAACAGAGCCTAGGCTGGCTGTTGCTCC
2I	Herrmann 1998	SEQ32	TTCAAGAACTCCCTTACTATCTTCGGGAGGCTCTGACTTGGAGAC TTGCAAAAGTTTCTGCTAAAGACCTTAGGCTATGCTTGTCTCTG
2J	AF026252, Lindeskog et al. 1998	HERV-H	TTCAAGAGACGCCCCCATTTACTTCAAGTCAAGCCCAAAATTTCTTCC TTATCTGTACCTATCTCCGATAATTTCTATATAAACAACACAGCTG
2K	Herrmann 1998	SEQ61	TTCAAGAGACGCCCCCATTTACTTCAAGTCAAGCTCTTCTCATGAT CTACTTTCTTCCATCATCTGTTTCTCACCTTATTCATATAC

2L	Herrmann 1988	SEQ88	TTTCAGAGACAGCCCCCATTAATCTTTAGTCAAGCTCTTTCTCATGAT CTACTTTCTTTCCATCCATCTGTTCTCACCTTATTTCAATATATG
3A	U35236, Medstrand et al. 1983	HML-3	ATGTTAAACAGTCCAAACAATTTGCCAGACTTATATGGGCAAGCAA TTGAACCTTACTCTTAAAAAATTTTACAGTGTACATATATTTCAAT
3B	S86678, Kalden und Herrmann, 1983	HERV1 SLE	ATGATTAACAGTCCAAACAATTTGCCAGGCAATATGAGGGCAAC AAWTGAACCTACYTGTAAAAAATTTTTCAGTGTACATATTTCAAT
3C	S77583 Lefebvre et al. 1995	RT244	ATGTTAAACAGTCCCAACAATTTGCCAGTCAATATGTTGGGCAAGCA ATTGAACCTACTCTTAAAAAATTTTACAGTGTACATATTTAC
3D	Herrmann 1998	SEQ28	CGTGTAAACAGTCCGACTATTTGCCAGAAATTTTACAGTGTACATATTC CAATTTGAATCTACTCGTAAAAAATTTTTCAGTGTACATATTTTC
3E	U27240 Seifarth et al. 1995	ERV-FRD	TTTCAGAGATAGTCCCAATTTGTTGGGCAAGCTTGGCTAGATA TTTGCAGGACCTAAGTCTTTATATGGAAGGCAATCTCCTACAG
3F	Herrmann 1988	SEQ46	TTTCAGAGATAGTCCCAATTTGTTGGGCAAGCTTGGCTAGATAAT TGCAGGACCTAAGTCTTTATATGGAAGGCAATCTCCTACAGTACA
3H	M92067 Maeda and Kim 1980	HERV-I	TTTCATGGATTCACCCCAAGCTTTTGTGCAAAATTTTAGAACAAAGTG CTAGACAAAGTTTCTGTTCANAAACAATTTATGCTGCTTCAATAT
3I	U27241 Seifarth et al. 1995	HERV-IP (T47D)	TTTCAGAGATAGTCCCAATTTGTTGGGCAAGCTTGGCTAGATAAT ATTAGAAAAAGTTTTCATTTCCAGAACAAATATGCTTCTCCAG
3J	Herrmann 1988	SEQ85	AGACTCCCTAATCTTTTGGCCAAATTTTAGAACAAAGTGTAG AAAAAGTGTCTATCCCAAGCAATATATGCTGCTCTAGTACATG
3L	McMillan and Singer 1983, M80343	LINE-I	TGCCCTCTCTACCACTCTTATTTCAACATAGTGTGGAAGTCTTG GCCAGGCAATTTAGGCGAGGAGGAAATAAAGGTATTTCAATTA
4A	Herrmann 1988	SEQ34	ATGTTAAATGGTCCCAACAATTTGCCAGACATATGTTGGGCAAGCA CTTGAACCTTACTCATATAAATAATTTTTCAGTGTACATATTTCACTA
4B	Herrmann 1988	SEQ42	ATGTTAAACTGTCCCAACAATTTGTTCAGACTTATGAGAACAAAGCA ATTGAACCTACTCATATAAATAATTTTTCAGTGTATATTTCAATTA
4C	Herrmann 1988	SEQ43	ATGTTAAACAGTCCCAACAATTTGCCAGATGACGTGTGCAAGC AATTGAACCTACTGTATAAATAATTTTGGTGTACATTTTCNTTA
4E	X57147, La Mantia et al. 1991	ERV9	TTTAGGGATAGCCCTCATCTGTTTGGTCCAGGCCCTAGCCCAA GATCTAGGCCCACTTCTCAAGTCCAGGCACTCTGTCCTTCAA
4F	Herrmann 1988	SEQ49	TTTCAGGGATAGCCCCCATCTATTTGGTCAGGATTTAGCCAAGA CTTGAGCCAGTTCTCATACCTGGACACTCTGTCCTTGGTATATA
4G	Herrmann 1988	SEQ59	TTTAGGGATAGCCCTCATCTGTTTGGTCCAGGCCCAAG ATCTAGTTCACTTCTCAAGTCCAGGCACTCTGTTGTTTCAGTAC
4H	Herrmann 1988	SEQ60	TTTAGGACAGCCCTCATCTATTTCCGTCCAGGCACTTCAATTAG ACCTCTCCAGCTACATCTTCNCCYNGCATCTTGTCTTCAATTA
4I	Herrmann 1988	SEQ63	TTTCAGGGATAGTCCCATCTATTTGGCCAGGCAATTAACCCGAG ACTTAGCCAGTTCTCATACGTGGACACTCTTGTCTTGTGTA

4J	Herrmann 1988	SEQ84	TTTAGAGATAGCCCTCACCTGTTTGGCCAAAGCATTTGGCCAAGA TTTAAGTCACCTTCTTGACACCAGGTACCTTAATCTTCAATAT
4L	AF008668 Blond et al. 1989	HERV-W	TTTCAGGATAGCCGCCCATCTATTGGCCAGGCATTTAGCCCCAAG ACTTGAGTCAATCTCATACCTGGACACTCTTGTCTTCAGTAC
5A	AF020082 Selfarth et al. 1985	HERV-K (T47D)	CATGCTAATAGTCCCACTATTGTGTCAGTATTTTGTGGGCGGTG GCTTCAACCTGTACAGGATCAGTTTCCCGATGTTACATCGTTCA
5B	Herrmann 1988	SEQ05	ATGCTTAATAGTCCCACTATTGTGTCAGTATTTTGTGGGCGGTG CTTCAACCTGTACAGGATCAGTTTCCCGATGTTACATCGTTTAC
5C	Herrmann 1988	SEQ10	ATGCTTAATAGTCCCACTATTGTGTCAGTATTTTGTGGGCGGTG TTCAACCTGTACAGGATCAGTTTCCCGATGTTACATCGTTTAC
5E	U46939 Griffiths et al. 1987	SEQ U46939	ATGACTAACAGTCTGCCATATGCCAGCTATATGTTGACCAGGCA GTAGAGCTGTTCCGACAGCTGCCCAAAAGTACAAATTTTACAC
5F	U39937 LI et al. 1995	U39937	ATGCTTAATAGTCCCACTATTGTGTCAGTATTTTGTAGGTCGAGCT CTTCAACAGTTAGAGAAAGTTTTCAGACTGTTATATATTATTCAT
5G	Herrmann 1988	SEQ35	AACAGTATCAGGAGTTTACAGCCAGGTAGTCAGGAGGAACTT AGTCATCCTGGTGCACTGGAAAGGCAATTCGATTTAAAGGCAGTCT
5H	Herrmann 1988	SEQ36	AACAAATGTAGAAATGGCTCACAGAACTCAGGAAATACTTTACTT GTATTTAATGGTTTGTATACATAAGATACAACTCAAGGAACCACT
5I	Herrmann 1988	SEQ41	TACCATGACAGCAAGCTTCTGTTTACCAGGCAAGGCACTGCAAGG CAAGCATTGAATGTGATGTTTGAGGGCAGGTGATCGGGTTACA
5J	Herrmann 1988	SEQ77	TGGAGGGAGGACTTCAGACACATTTCTTAAATGT GGCTCCTGTAAATTTTAAACACATTCACACATGCTA
6A	U35161 Medstrand et al. 1993	HML-5	ATGCTGAACAGTCTTACCATGTGTCAGTAACTGTAAATCAAGCT TTGCTCCCGAGTAGAAATTAATTTCTTAATTCGAAGATATTTCAT
6E	HRU46939 Griffiths et al. 1997	HRV5	ATGACTAACAGTCTTCCCATATGCCAGCTATATGTTGACCAGGCA GTAGAGCTGTTCCGACAGCTGCCCAAAAGTACAAATTTTACAC
6F	Y07725	Foamy virus	TTTTTAATAGTCCAGCATTTGTTTACAGCTGATGTAGTAGATTTA CTAAAGAAATCCCTAATGTACAAGTGTATGTTGATGATATATAT
6G	Tuke et al. 1997	HTLV1	GTTTAAATATAGTCCACCTGTTGAAATGCAGCTGGCCCATAT CCTGCAGCCCATTCGGCAAGCTTTCCCAATGCACATATTCTTCA
6H	M10080, Shimotohno et al. 1985	HTLV2	GTTTAAACAGCCCCCAGCTCTTTCGAACAACTATAGCAGCCGT CCTCAACCCCATGAGGAAATGTTTCCCACTGACCATTTGTCCA
6I	Tuke et al. 1997	HIV1	ATGGAAGGATCACAGCAATATTCAAAGTAGCATGACAAAT CTTAGAGCCCTTTAAACAAATCCAGACATAGTATCTATCA
6J	J04542	HIV2	TGGAAAGGATCACAGCAATCTTTCAATTCATGATGAGGCAATC TTAGAACCCTTCAGAAAGCAACCAAGCAGTCAATTTCTCATCCA
7A	U60269 Medstrand et al. 1997	HML-6	ATGCTTAACAGTCTTACCGTATGTGAGCAATTTGTAGGACAGGCA TTAAAGAGCCCTCGGAATATGTTTCTTACTGCTTACATCATTCAT

7B	Herrmann 1988	SEQ38	ATGCTCAACACCTACGTTAAGTCAGCAGTATTTGTAGGAAGAGCAATT AAAGGACTCTCAGATATATGTTCCCACTGCTACATCGTTTCAATTA
7C	Herrmann 1988	SEQ56	ATGCTTAACAGCATATATATCAGCATGTTGTAGGATAGGCATTAA GGTGCTCTGAATATGTTCCACAGCCTACATCCGTCAATATAT
7E	M15122 Moore et al. 1987	MMTV	ATGAAAATAGCCCTACTTATGTCAAAAATTTGTGGACAAAGCT ATATTGACTGTAAGGGATAAATACCAAGACTCATATATGTGCAT
7F	AF038600 Akiyoshi et al. 1988	PERV	TTCAAGAACTCCCGACCATCTTTGACGAAGCCCTACACAGAGAC CTGGCCAACTTCAGGATCCAACACCTCAGGTGACCCCTCCTCCAG
7G	D10032 Kato et al. 1987	BaEV	TTCAAAAATCTCCGACTCTCTTCGATGAGGCTCTCCACAGGGAC CTCACCGACTCCGGACCCAGCATCCAGAGTGACCCCTGCTCCAG
7H	M28927 Delassus et al. 1989	GalV	TTCAAGAACTCTCCCACTCTCTTCGACGAGGCCCTCCACCGAGAT TTGGCTCCCTTTAGGGCCCTCAACCCCGAGGTGGTGTACTCCAA
7I	J02255 Van Beveren et al. 1981	MoMuLV	TTCAAAAACAGTCCGACCTGTTTGATGAGGCACTGCACAGAGAC CTAGCAGACTCCGGATCCAGATCCAGCCAGACTTGATCCTGCTACAG
7J	M12349 Sonigo et al. 1986	MPMV	ATGGCCAAACAGTCTACCTTATGTCAAAAATATGTGGCCACAGCC ATACATAAGGTAGACATGCCTGGAAACAAATGTATATATATACAT
8A	U07856, Dangel et al. 1994	HERV-KC4	ATGTTAATATAGTCCACAGTTTGTCAAACTTTGTAGGCGAAACT ATCCAGCCTGTAGAGATCAGTTTCCAGATTGTGCAGCAAAAAG
8B	Herrmann 1988	SEQ31	ATGTTAAACAGTCCAGTGTGTCAAACTTTGTAGGCAAAAGCT ATCCAGCTAGTTAGAGATCAATTTCCAGATTGTACATCATTCAT
8E-8H	human genomic DNA	Internal control	100 ng 10 ng 1 ng 0.1 ng
8I-8L	mixed oligo primers	Internal control	100 pmol 10 pmol 1 pmol 0.1 pmol

Tabelle 3.

A. Humane endogene retrovirale Sequenzen

Typ B Retroviren (HERV-K-Überfamilie)	HML-1 Untergruppe	HML1 (1A) Seq29 (1B*)
	HML-2 Untergruppe	HERV-K10 (2A) U87592 (2B)
	HML-3 Untergruppe	HML-3 (3A) S66676 (3B*) RT244 (3C*) Seq26 (3D*) Seq34 (4A*) Seq42 (4B*) Seq43 (4C*)
	HML-4 Untergruppe	HERV-K-T47D (5A) Seq05 (5B) Seq10 (5C)
	HML-5 Untergruppe	HML-5 (6A)
	HML-6 Untergruppe	HML-6 (7A) Seq38 (7B) Seq56 (7C)
	KC4 Untergruppe	HERV-K-C4 (8A) Seq31 (8B)
	unbestimmt	U39937 (5F)
Typ C Retroviren	HERV-H & verwandte	AF026252 (2J) Seq61 (2K) Seq66 (2L)
	ERV9 & verwandte	ERV9 (4E) Seq49 (4F) Seq59 (4G) Seq60 (4H) Seq63 (4I) Seq64 (4J)
	ERV-FRD	ERV-FRD (3E) Seq46 (3F)
	HERV-ERI Familie	HERV-E(4-1) (2H) Seq32 (2I)
	HERV-I & verwandte	HERV-I (3H) HERV-IP-T47D (3I) Seq65 (3J)
	HERV-T	S71 pCRTK1 (2E) S71 pCRTK2 (2F)
	HERV-W	AF009668 (4L)
Typ D Retroviren	MPMV verwandte	Seq36 (5H)

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Foamy Virus verwandt	HERV-L & verwandte	G895836 (1E) Seq39 (1F) Seq40 (1G) Seq45 (1H) Seq48 (1I) Seq51 (1J) Seq58 (1K)
unbestimmte retrovirale Elemente		U46939 (5E) Seq35 (5G) Seq41 (5I) Seq77 (5J)
humane nonvirale Retroposons		LINE-1 (3L)

B. Exogene Retroviren

Humane exogene Retroviren	HRV5 (6E) Foamy virus (6F) HTLV-1 (6G) HTLV-2 (6H) HIV-1 (6I) HIV-2 (6J)
endogene Säuger-Retroviren	MMTV (7E) PERV (7F) BaEV (7G) GaLV (7H) MoMuLV (7I) MPMV (7J)

Ansprüche

1. Aus Vorwärtsprimern und Umkehrprimern bestehende Primermischung ("MOP") für die PCR, dadurch gekennzeichnet,
daß Vorwärtsprimer und Umkehrprimer degenerierte Oligonukleotide sind,
daß entweder ("MOP-ABD")
die Vorwärtsprimer die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 1, nämlich:
ARAGTNYTDYCHCMRGGH, mit einem "Kopf" am 5'-Ende und mit 3456 Degenerationen
und die Umkehrprimer die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 2, nämlich:
NWDDMKDITYATCMAYRWA, mit einem "Kopf" am 5'-Ende und mit 27648 Degenerationen aufweisen,
oder ("MOP-C")
die Vorwärtsprimer die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 3, nämlich:
TKKAMMSKVYTRCYHCARGGG, mit einem "Kopf" am 5'-Ende und mit 3072 Degenerationen und
die Umkehrprimer die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 4, nämlich:
MDVHDRBMDKYMAYVYAHKKA, mit einem "Kopf" am 5'-Ende und mit 8192 Degenerationen aufweisen,
und daß "Kopf" für eine Nukleotidsequenz steht, die eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym und eine Klammer-Sequenz am 5'-Ende dieser Schnittstelle umfaßt und deren Länge die die halbe Länge der kompletten Nukleotidsequenz des Vorwärts- oder Umkehrprimers nicht überschreitet.
2. Primermischung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß der "Kopf"-Abschnitt der in den Sequenzprotokollen dargestellten Nukleotidsequenzen die Nukleotidsequenz GAAGGATCC aufweist.

3. Verfahren zum spezifischen Nachweis und zur Identifizierung retroviraler Nukleinsäuren / Retroviren in einem Untersuchungsgut, gekennzeichnet durch Art und Reihenfolge der nachstehend genannten Maßnahmen:
 - Isolierung der Nukleinsäuren, nämlich DNS- und/oder RNS, aus dem Untersuchungsgut,
 - Durchführung einer PCR mit den isolierten DNS oder einer RT-PCR mit den isolierten von RNS unter Verwendung von einer oder beiden Primermischungen gemäß Anspruch 1
 - Aufreinigung der erhaltenen (RT-) PCR-Amplifikate und Einsatz derselben in einem RDBH-Verfahren unter Verwendung immobilisierter RDBH-Sonden, die jeweils (je Sonde) synthetische Oligonukleotide umfassen, deren Nukleotidsequenz der retroviralen Nukleotidsequenz des retroviruspezifischen Reverse-Transkriptase-Gens der mit dem betreffenden Dot nachzuweisenden Virusart oder einem Abschnitt einer solchen reviralen Nukleotidsequenz entspricht und keine Überlappung mit den Nukleotidsequenzen der Vorwärtsprimer und Umkehrprimer der in der PCR oder RT-PCR eingesetzten Primermischungen aufweist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet daß die Nukleotidsequenzen der synthetischen Oligonukleotide der RDBH-Sonden zu der retroviralen Nukleinsäureregion des Reverse-Transkriptase-Gens zwischen den hoch konservierten Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L oder zu einem Abschnitt dieser Region korrespondieren.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß als immobilisierte RDBH-Sonden jeweils eine Mischung aus äquimolaren Mengen der beiden Partner eines Paares synthetischer Oligonukleotide, das zusammen zu einem vorzugsweise 90 bp langen Abschnitt aus der Nukleinsäureregion des Reverse-Transkriptase-Gens zwischen den hoch konservierten Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L korrespondiert, eingesetzt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Partner des Paares synthetischer Oligonukleotide annähernd gleich groß bzw. gleich lang, vorzugsweise ca 45 bp lang sind.
7. Verwendung von einem oder mehreren synthetischen Oligonukleotid(en), dessen/deren Nukleotidsequenz(en) mit der Nukleinsäureregion eines retroviruspezifischen Reverse-Transkriptase-Gens zwischen den hoch konservierten Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L oder mit einem Abschnitt dieser Nukleinsäureregion korrespondiert/ korrespondieren, als Reverse-Dot-Blot-Hybridisierungs-Sonde(n) in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 6.
8. Verwendung äquimolarer Mengen zweier synthetischer Oligonukleotide, die zusammen, hintereinandergereiht zu einem vorzugsweise 90 bp langen Abschnitt aus der Nukleinsäureregion des Reverse-Transkriptase-Gens zwischen den hoch konservierten Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L korrespondieren, als Reverse-Dot-Blot- Hybridisierungs-Sonde(n) in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 6.
9. Diagnosekit zum spezifischen Nachweis und zur Identifizierung retroviraler Nukleinsäuren / Retroviren in einem beliebigen Untersuchungsgut, umfassend wenigstens eine der aus Vorwärtsprimern und Umkehrprimern bestehenden Primermischungen für die PCR gemäß Anspruch 1 und wenigstens eine Reverse-Dot-Blot-Hybridisierungs-Sonde gemäß Anspruch 7 oder Anspruch 8.

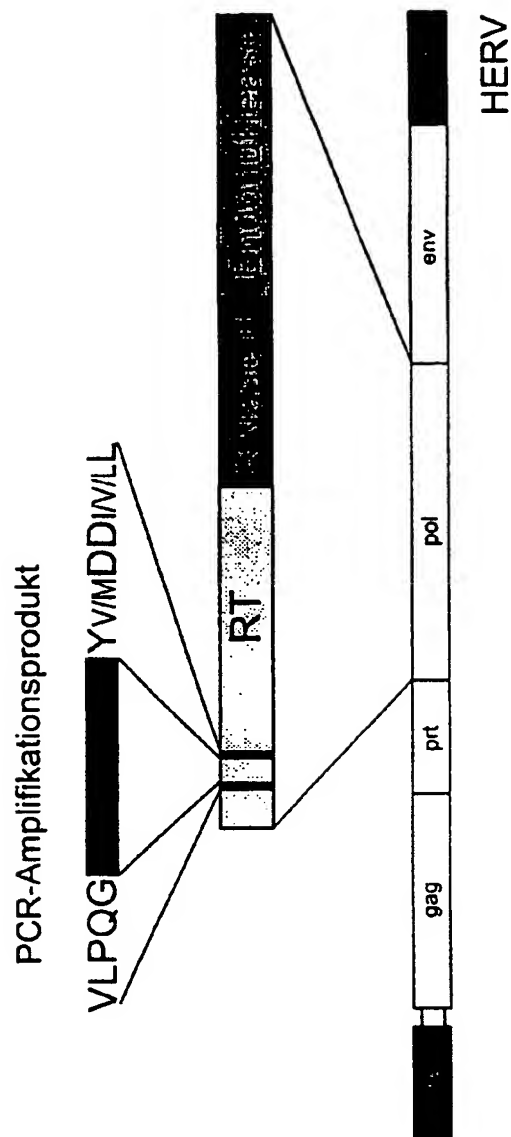


Fig. 1

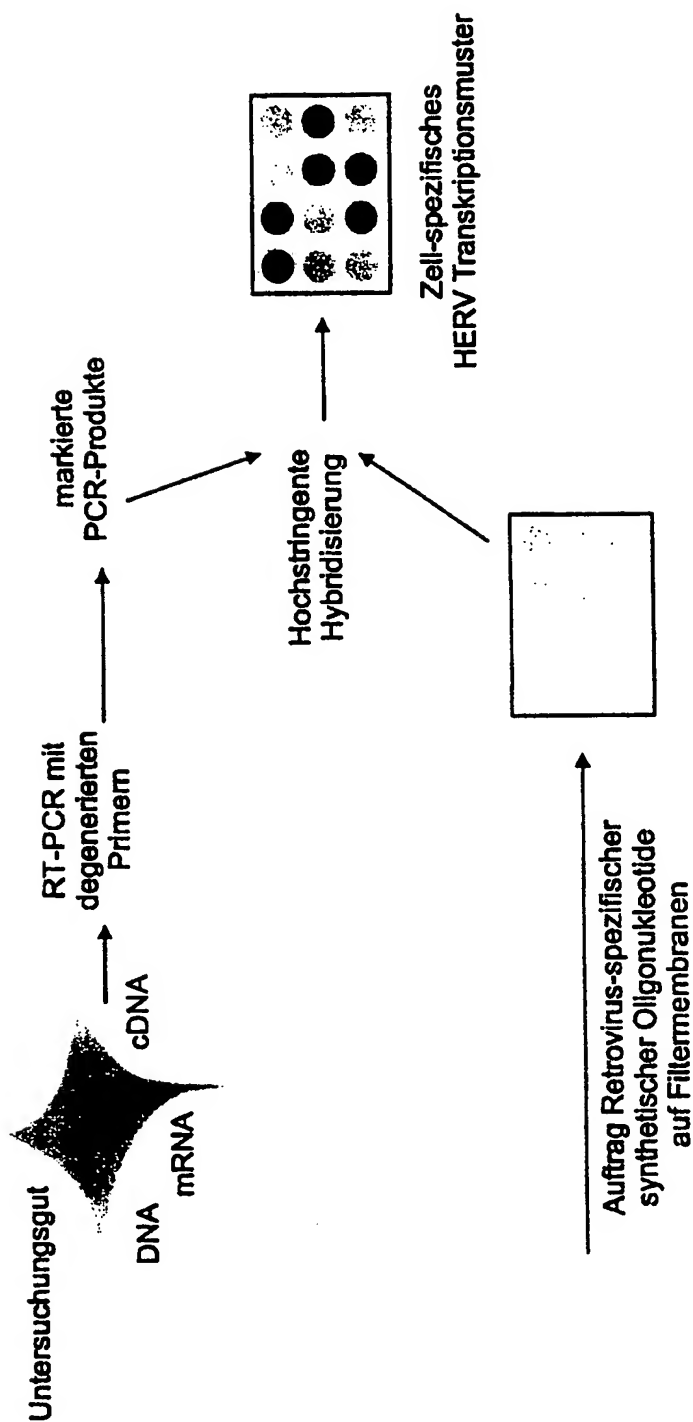
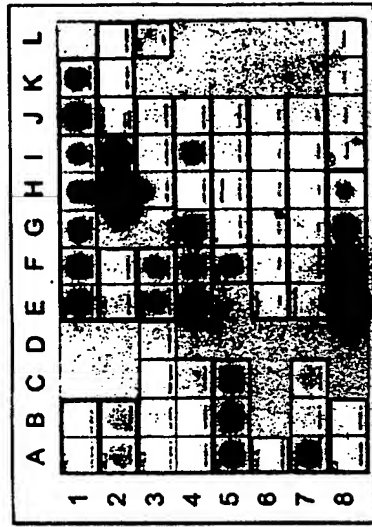
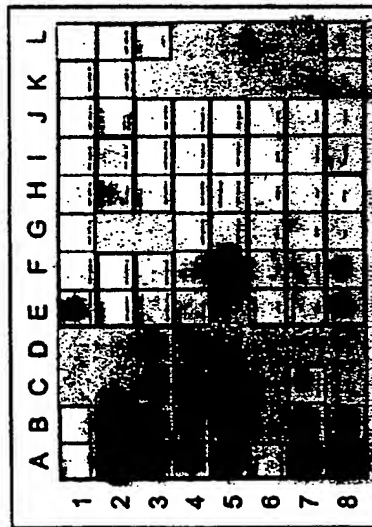


Fig. 2

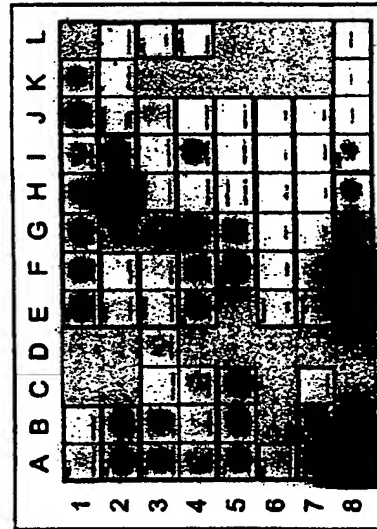
Fig. 3



A

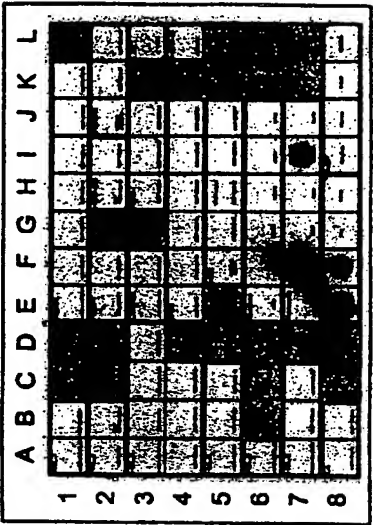


B

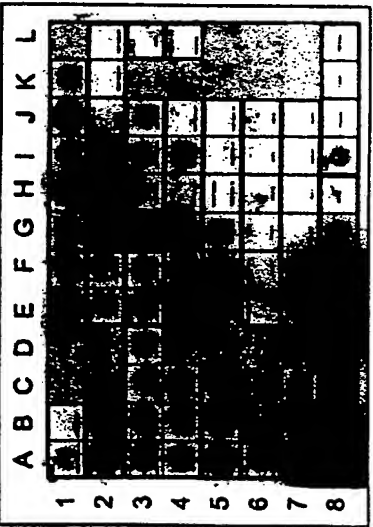


C

Fig. 4



B



A

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

<120> Verfahren zum spezifischen Nachweis und zur
Identifizierung retroviraler Nukleinsäuren/Retroviren
in einem Untersuchungsgut

<130> sei 1

<140>

<141>

<150> DE 199 21 419.0

<151> 1999-05-08

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

aragtnytdy chcmrggh

18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

nwddmkdtya tcmayrwa

18

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

tkkammskvy trecycargg g

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

mdvhdrbmdk ymayvyahkk a

21